

REVISTA FACULTAD DE
FARMACIA

Volumen 87

Nº 3

2024

ISSN: 0041-8307



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela

Vol. 87 - Nº 3 - 2024
ISSN: 0041-8307
ISSN-e: 2739-0373
Depósito legal: 195902 DF 224
Caracas/Venezuela
Indexada en LILACS, Latindex y Revencyt

Universidad Central de Venezuela

Rector

Dr. Víctor Rago

Vicerrectora Académica

Dra. María Fátima Garcés

Vicerrector Administrativo

Dr. José Balbino León

Secretaria

Dra. Corina Aristimuño

Facultad de Farmacia

Decano (E)

Dr. Michel Mijares

Directora Administrativa

Dra. María Isabel Calderón

Coordinadora Académica

Esp. Dhilcia Astrid Pinto

Directora del Instituto de

Investigaciones Farmacéuticas

Dra. María Gabriela Matos

Director de Postgrado

Dr. Michael Mijares

Coordinadora de Extensión

Esp. Marisol Gómez

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: *In Memoriam* del
Dr. Carlos Eduardo Ciangherotti Franco

Contenido

<i>In Memoriam</i> . Semblanza de un docente, científico, decano y gran ser humano. Dr. Carlos Eduardo Ciangherotti Franco	145
Popat N. Patil, Ph.D. Profesor Emérito de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del Estado de Ohio, Estados Unidos de Norte América	
MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN	151
Metabolitos secundarios mayoritarios de las hojas de <i>Antidaphne viscoidea</i> Poepp. & Endl. (Santalaceae)	
KATIUSKA CHÁVEZ, GUIDMAR DONALLE, STEPHEN TILLET, ALÍRICA I. SUÁREZ	159
Efecto de la <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa en células de epitelio renal en cultivo	
CARLOS CIANGHEROTTI †, GIOVANNINA ORSINI, ANITA ISRAEL	171
Bioavailability and molecular recognition between secondary metabolites of <i>Euphorbia hirta</i> L. and 5-lipoxygenase using fragment molecular orbital method and pair interaction energy decomposition analysis	
EMILDO MARCANO, YSBELIA SÁNCHEZ	182
Prevalencia de pacientes con intentos suicidas en la población amazónica, 2019-2024	
MARÍA L. CARDOZO SOTO, NATALY B. VISTIN GUAMANTAQUI, KARLA J. PADILLA FIALLOS	198
Estandarización de PCR múltiple para identificación simultánea de los patógenos <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i> en queso blanco.	
MARÍA G. CESTARI B., MARIAM A. OTERO T., MARÍA G. TORRES R., GRICELIS P. MARTÍNEZ, MARÍA I. CALDERÓN, MICHAEL R. MIJARES	209
Síntesis y Caracterización de un Nanocompuesto de Cobrepoliquitosano/Ácido Hialurónico y su Actividad Antimicrobiana	
JOSÉ D. TOVAR, MARÍA RODRÍGUEZ, JACOBUS DE WAARD, FRANKLIN CLARO	223
Desarrollo de gel tópico a base de ácido hialurónico y lidocaína para el tratamiento de úlceras bucales	
MARÍA V. DURAN MENDOZA, LORENA M. JIMÉNEZ BÁRCENAS, KELLY A. MORENO OROPEZA, RAUDET A. VILLAMIZAR CORTEZ, ISABEL ANDUEZA	236
Evaluación comparativa entre los perfiles de disolución de tabletas de clorhidrato de propranolol genéricas del mercado venezolano y el importado	247
JANESKY AGUDELO, JENNIFFER TOVAR, MARISABEL BOR	
Educación en Bioética: Orígenes y evolución histórica	
MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN, MARITZA PADRÓN-NIEVES	257
Validación de un método analítico por HPLC en fase reversa para la determinación de vitaminas B1 y B2 en cereales.	
GREILE D. ORTIZ M., ALICIA M. RINCÓN C., LIZET Y. BOU RACHED R	265
Desarrollo y validación de un método analítico RP-HPLC para la determinación cuantitativa de Dipirona en tabletas	281
LUIS A. TINEO A., MARISABEL BOR	
Normas de publicación	301



Esta revista se publica con el auspicio del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela en formato digital, en su Repositorio Institucional Saber UCV



In Memoriam

Semblanza de un docente, científico, decano y gran ser humano, Dr. Carlos Eduardo Ciangherotti Franco

In Memoriam

A portrait of a teacher, scientist, dean and great human being.
Dr. Carlos Eduardo Ciangherotti Franco

ANITA STERN ISRAEL



El Dr. Carlos Eduardo Ciangherotti Franco, nace el 03 de junio de 1978, en Maracay, Edo. Aragua. Es hijo de Eduardo Ciangherotti y de Omaira Franco de Ciangherotti, de Guanare, estado Portuguesa. Por ello, aun cuando se define como aragueño de origen y corazón; innegablemente se siente como hijo de Guanare. Desde el pre-escolar hasta la educación media estudió en el Colegio católico Sagrado Corazón de Jesús, de donde egresa como bachiller y decide inscribirse en la Unellez a estudiar Ingeniería en recursos naturales renovables. Al cabo

de dos semestres de estudios, toma la decisión de trasladarse a la Universidad de los Andes y se matricula en la Facultad de Farmacia, en Mérida en 1997, graduándose de Farmacéutico el año 2002, con Mención de Toxicología.

Durante su carrera comenzó a destacarse y fue Preparador en Química Orgánica Básica en la Cátedra de Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, durante el período de marzo 2000 a Julio 2001.

Prof. Jubilado, Jefe del Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: astern88@gmail.com. Orcid: [0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.2](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.2)

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

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 145-150. 2024

En el año 2003, decide viajar a Caracas e iniciar su carrera como docente e investigador en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Allí se inicia como Preparador en Química Orgánica I en la Cátedra de Química Orgánica, y luego como Profesor Instructor a medio tiempo en la Cátedra de Toxicología Forense, entre mayo-agosto de 2004. En septiembre de 2007-2014, pasa a ser Profesor Instructor de la Unidad de Cultivo Celular, adscrita al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, con carga docente en pregrado en las Cátedras de Bioquímica y Biología.

Siempre inquieto, con deseos de superación y de nuevos conocimientos, en el año 2004 el Dr. Ciangherotti entra al Postgrado de Farmacología de la Facultad de Farmacia y es contratado como Asistente de Postgrado del Laboratorio de Farmacología de mayo-julio de 2005. Ese mismo año se integra al Laboratorio de Neuropeptidos, donde bajo la tutoría de la Dra. Anita Stern Israel, desarrolla la Tesis Doctoral para optar al Título de Doctor en Ciencias, Mención Farmacología, titulada: "*Efecto del extracto acuoso de la raíz de Ruellia tuberosa L. sobre el daño renal en la diabetes. Papel del estrés oxidativo*". En esta investigación, estudió las propiedades protectoras de esta planta medicinal frente al daño renal inducido por la diabetes, centrándose en el mecanismo del estrés oxidativo. Sus hallazgos establecieron a la *Ruellia tuberosa* L. como un antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, tanto *in vivo* como *in vitro*, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, del estrés nitrosativo, y de la vía de señalización de la PKC-NF-kB. Esto aportó información acerca de los efectos farmacológicos de

la especie, a la vez que contribuyó tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género, sentado así las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco. Su trabajo generó una serie de seis publicaciones y contribuyó en forma significativa a la comprensión de posibles terapias basadas en plantas para enfermedades crónicas como la diabetes. Ciangherotti, recibe su título de Doctor en Ciencias con mención en Farmacología el año 2012, en acto académico en el Aula Magna de la UCV.

A través de su formación académica y el arduo trabajo en el área de investigación, se destacó en el campo de la farmacología y la química medicinal, lo que le permitió una comprensión profunda de los procesos bioquímicos y farmacológicos relacionados con el desarrollo y la acción de los medicamentos. Su trayectoria por la investigación, en especial durante casi 20 años compartidos en el Laboratorio de Neuropeptidos, nos mostró su gran inteligencia y preparación, su empatía y liderazgo, su dedicación incansable al trabajo, la pasión por la ciencia y la educación, dejando una huella imborrable en nosotros todos sus compañeros (Figura 1).



Figura 1. Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, UCV

El Dr. Ciangherotti además de la farmacología, tenía pasión por la Química Orgánica y la Química Medicinal, por lo que en el año 2016 opta al Doctorado en Química, en las Facultades de Ciencias y Farmacia, bajo la tutoría de las Dras. María Rodríguez y Anita Stern Israel, con la Tesis titulada: "Aislamiento y evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de los metabolitos secundarios mayoritarios de las Hojas de *Cestrum buxifolium Kunth*". En el año 2023 tenía pautado la obtención de su segundo doctorado en Química de Productos Naturales, que lamentablemente no pudo llegar a su feliz término.

El Dr. Carlos Ciangherotti recibió varios premios y reconocimientos a lo largo de su carrera académica y científica, especialmente por su trabajo en farmacología, ya que participó en varias investigaciones científicas, destacándose en estudios sobre plantas medicinales. Una de sus contribuciones más notables y que le valió el Premio Nacional a la Investigación Médica y Farmacéutica, VI Premio Fundación CAVEME en 2013, fue su trabajo sobre el efecto protector de la *Ruellia tuberosa* L. contra el daño renal inducido por la diabetes, titulado: Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L sobre el daño renal inducido por la diabetes en modelos preclínicos útiles para el desarrollo de fitofármacos, por los autores Carlos Ciangherotti, Anita Israel, Giovannina Orsini, María Margarita Salazar-Bookaman, Lourdes Perdomo, Marco Álvarez y Ana María Maldonado (Figura 2), por considerarse que dicho estudio contribuyó al desarrollo potencial de un fitofármaco con aplicaciones terapéuticas futuras. También, en 2015, fue galardonado con el Premio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, Mención Honorífica al mejor trabajo en Ciencias de

la Salud del Ministerio del Poder Popular para Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología, por el trabajo titulado: Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental, por los autores Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Salazar-Bookaman MM, Israel A. Adicionalmente recibió el Premio Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación al Mejor trabajo en Ciencias exactas, del Ministerio del Poder Popular de Ciencia y Tecnología 2017.

Una de sus preocupaciones fue difundir el conocimiento y la experiencia, y visibilizar los resultados de las investigaciones, por lo que participó como ponente o como co-autor en presentaciones en eventos científicos nacionales y en el extranjero con al menos 60 resúmenes. Publicó 35 artículos en prestigiadas revistas nacionales e internacionales.

En colaboración con el Dr. José Suarez-Torres del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia, y su grupo de investigación, publica una serie de nueve estudios en el área de la toxicología, destacando aquellos que abordan la probabilidad numérica de carcinogenicidad en humanos de ciertos fármacos, como agentes alquilantes y venenos inhibidores de topoisomerasa. Este trabajo se centra en el uso de un enfoque predictivo basado en valores estadísticos, aplicable a 37 fármacos genotóxicos. Su investigación ayudó a mejorar la evaluación de riesgos y advertencias en el uso de estos medicamentos (Suarez-Torres y col., 2021). También, cabe mencionar los trabajos en colaboración con el Dr. Edgar del Carpio y su grupo en el que se destaca el



Figura 2. Premio Fundación CAVEME en 2013

análisis de mediciones potenciométricas en complejos ternarios de cobre (II) con ácido dipicolínico y ácido quinolínico, así como ácido láctico, ácido oxálico, ácido cítrico y ácido fosfórico, que son componentes del plasma sanguíneo. Los complejos ternarios y binarios aislados *in situ* de $\text{CuDiPic}(\text{H}_2\text{O})_2$ para determinar la actividad antioxidante, por su actividad inhibidora del anión superóxido (O_2^-), demostraron que los complejos de cobre (II) brindan efectos protectores (Del Carpio y col., 2022). Estos logros reflejan su impacto tanto en el ámbito de la investigación farmacológica como en su liderazgo en otras áreas del conocimiento.

El Dr. Ciangherotti tuvo la oportunidad de compartir sus conocimientos en el área de farmacología y toxicología dando apoyo y asesoría a Organismos gubernamentales y a la Industria Farmacéutica. Así, como Profesional independiente actuó como Consultor en Estudios Preclínicos, Clínicos y Toxicología Regulatoria (2000-2004), fue asesor del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (2019-2024), Conferencista en el área de bioequivalencia y medicamentos genéricos en el laboratorio Calox International C.A. (2012-2015), Conferencista sobre medicamentos antineoplásicos y en bioequivalencia básica

y clínica en el laboratorio Novartis (2010-2013) y Conferencista en medicamentos antineoplásicos y de la línea neurológica en el laboratorio AstraZeneca (2006-2010), todo esta actividad le permitió tener una visión más amplia acerca del ejercicio profesional fuera del ámbito estrictamente académico universitario.

Para el año 2023, después de 15 años, son convocadas las elecciones para elegir autoridades rectorales y decanales, en la Universidad Central de Venezuela. El Dr. Ciangherotti decide postularse a decano de la Facultad de Farmacia, siendo electo el 20 de junio de 2023. Convirtiéndose a sus cuarenta y cinco años en el Decano más joven de la UCV, con la responsabilidad de orientar la formación académica, de investigación y extensión de los futuros farmacéuticos que forma la primera casa de estudios venezolana.

Su gestión decanal en la UCV se centró en la modernización de la Facultad de Farmacia, en especial en la del currículo académico, enfocándose en la transformación de los planes de estudio con un enfoque basado en competencias, en lugar de objetivos tradicionales, para alinearlos con las demandas actuales del mercado farmacéutico, incluyendo áreas

críticas como el análisis de medicamentos y el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la farmacología. Este cambio estaba orientado a preparar mejor a los estudiantes para las demandas de la industria farmacéutica y la tecnología emergente, adaptándose a las necesidades actuales del mercado farmacéutico. Uno de sus retos principales fue combatir la fuga de talentos, buscando incorporar a profesores jubilados y egresados en asignaturas clave, a pesar de las limitaciones salariales del sector universitario en Venezuela. Ciangherotti también impulsó la autogestión de la Facultad mediante la oferta de servicios y el fomento de la investigación y la extensión universitaria. Esto enfocándose en la investigación y en la formación de nuevos profesionales en el área de la salud, contribuyendo al avance del conocimiento en farmacoterapia y otros campos relacionados, promoviendo la importancia de la farmacia en el sistema de salud venezolano.

Siempre mostró un fuerte compromiso con la docencia y la investigación, trabajando para retener y atraer talento académico en medio de una difícil situación laboral universitaria. Colaboró con egresados de la facultad para impulsar iniciativas que apoyaran tanto a los estudiantes como al cuerpo docente. Integró nuevas tecnologías y prácticas farmacéuticas a la enseñanza, en conjunto con egresados y profesionales de la industria lo que permitió que los estos estuvieran al tanto de los avances en farmacología y química medicinal.

Durante su tiempo como decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, el Dr. Carlos Ciangherotti trabajó activamente en el establecimiento de convenios institucionales

con diversas organizaciones y actores del sector farmacéutico. Estos acuerdos tenían como objetivo mejorar tanto la educación como la investigación en la facultad. Algunos aspectos destacados de su gestión incluyen: 1. La promoción de la participación de egresados que trabajaban en la industria farmacéutica para colaborar como docentes invitados. A través de esta simbiosis, la facultad podía mantenerse actualizada con las tendencias y necesidades del sector farmacéutico, asegurando una formación más relevante para los estudiantes; 2. Inició la implementación de programas de autogestión que incluían la oferta de servicios especializados al sector privado, lo que permitió generar ingresos adicionales para la institución y fortalecer las relaciones con el ámbito empresarial. 3. Debido a la migración de docentes activos, Ciangherotti gestionó convenios con profesores jubilados para su reincorporación en la enseñanza, especialmente en áreas claves que requerían su experiencia. 4. Durante su gestión, un grupo de egresados propuso donar un laboratorio para la facultad, una clara muestra de los vínculos que estableció entre la academia y los profesionales en el ejercicio. Estos convenios y colaboraciones ayudaron a fortalecer la formación de los estudiantes y a mantener la calidad académica en la facultad en un contexto de crisis en Venezuela.

El Dr. Ciangherotti fue merecedor de reconocimientos por su gestión decanal. Así fue invitado especial y ponente en la segunda edición de la Mesa de Negocios y actualización farmacéutica desarrollada en la ciudad de Mérida en 2023, recibió una placa de reconocimiento por parte de la Droguería Pico Bolívar "por su destacada trayectoria en la formación de profesionales farmacéuticos, así como su valioso aporte

y desempeño en la industria farmacéutica venezolana, siendo referente para las futuras generaciones”.

En enero 2024, la Federación Venezolana de Maestros y la Fundación para el desarrollo Integral del Docente, le otorgan la Distinción “*Sapiens magis*” en conjunto del presidente del Consejo Municipal de Baruta, la orden “26 de Junio” en su Única Clase, conferida en el marco de la celebración del Día internacional de la lucha contra los ilícitos y tráfico de Drogas.

Lamentablemente, fallece la tarde del viernes 06 de septiembre de 2024, en el Hospital Universitario de Caracas, dejando un gran vacío en la comunidad universitaria que había respaldado su gestión y sus esfuerzos por revitalizar la Facultad de Farmacia. Como homenaje póstumo, el 6 de septiembre de 2024, el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, acuerda otorgarle la Orden “Dr. José Luis Andrade”, en su única clase, al Dr. Carlos Ciangherotti, “Querido y Admirado Docente Investigador de nuestra casa de Estudios”.

El Dr. Ciangherotti no solo fue un mentor y guía para muchos estudiantes e investigadores, sino también un amigo leal y un pilar fundamental en nuestra comunidad académica. Su legado vivirá en las enseñanzas que compartió y en los corazones de quienes tuvimos el privilegio de conocerlo.

Referencias Bibliograficas

- Del Carpio E, Serrano ML, Hernández L, Madden W, Lubes V, Landaeta VR, Rodríguez-Lugo RE, Giuseppe Lubes, Stern A, Ciangherotti C, Jiménez L. 2022. Chemical speciation, antioxidant activity, and molecular docking of copper(II) complexes with pyridine dicarboxylic acids and different ligands of low molecular mass. *Physics and Chemistry of Liquids* 60:6:943-963.
- El Universal. 2013. Noticias de Venezuela y el Mundo. El efecto de una raíz en riñones deteriorados ganó premio Caveme. Disponible: <http://www.eluniversal.com/vida/131203/el-efecto-de-una-raiz-en-rinones-deteriorados-gano-premio-caveme-imp>
- Rodríguez Andarcia L. 2024. Entrevista al Decano de la Fac. de Farmacia, UCV: Dr. Carlos Ciangherotti. El Vitral de la Ciencia. Portal venezolano de Divulgación Científica. Disponible: <https://elvitraldelaciencia.org/revista/entrevista-al-decano-de-la-fac-de-farmacia-ucv-dr-carlos-ciangherotti/>
- Suarez-Torres JD, Orozco CA, Ciangherotti CE. 2021. The numerical probability of carcinogenicity to humans of some pharmaceutical drugs: Alkylating agents, topoisomerase inhibitors or poisons, and DNA intercalators. *Fundam Clin Pharmacol* 35(6):1069-1089.



Popat N. Patil, Ph. D.
**Profesor Emérito de Farmacología de la Facultad
de Farmacia de la Universidad del Estado de Ohio,
Estados Unidos de Norte América**

Popat N. Patil, Ph. D.
Professor Emeritus of Pharmacology, College of Pharmacy,
Ohio State University, United States of America

MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN



OHIO STATE UNIVERSITY (OSU) 1976

Conocí al Doctor Popat N. Patil en Caracas, en Julio de 1971 durante el Congreso Internacional de Ciencias Fisiológicas. En julio de 1972 fui aceptada para trabajar en la obtención de mi Doctorado en Farmacología (Ph. D.) en la División de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del Estado de Ohio. El Dr. Popat Patil fue mi Tutor.

El profesor Emérito Popat Narayan Patil nació en Chinchkhede, India. Se

graduó de Farmacéutico en 1956 en la Facultad de Farmacia Lallubhat Motilal de la Universidad de Gujarat en la India. Luego, fue aceptado para estudiar en la Universidad del Estado de Ohio (OSU) donde obtuvo los títulos de Magister Scientiarum (M.Sc.) y Doctor of Philosophy (Ph.D.) en Farmacología.

El Dr. Popat Patil ha sido profesor e investigador en el área de Farmacología Molecular en la Universidad del Estado de Ohio por más de 50 años. Su interés por la investigación le ha llevado por diferentes

Profesor Titular de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: mmsalazarb@gmail.com. Orcid: [0000-0002-4439-9856](https://orcid.org/0000-0002-4439-9856)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.3](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.3)

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

Recepción: 11/11/2024

Aprobación: 16/11/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 151-158. 2024

áreas de la farmacología cuyos resultados han representado importantes contribuciones en el campo de los medicamentos y los mecanismos de acción de los fármacos. Para obtener estos resultados ha sido necesario transitar por los caminos de la fisiología, de la bioquímica, de la biología molecular, de la toxicología y la farmacología, con algunos toques de anatomía. Toda esta investigación va acompañada del conocimiento y la experiencia de trabajo con las más variadas técnicas asociadas incluida la espectrometría de centelleo líquido, citometría de flujo, resonancia magnética nuclear, cultivo celular, trabajo con órganos aislados y animales enteros, entre otras. Como lo demuestran las publicaciones del Dr. Patil, desde sus inicios como investigador trabajó principalmente sobre los aspectos estereoquímicos de las aminas simpaticomiméticas, sus receptores, agonistas y antagonistas. Además, en un área relacionada como son los parámetros cuantitativos de la interacción fármaco-receptor en la membrana celular, los componentes iniciales de la eficacia de los fármacos y el antagonismo farmacológico, es decir antagonismo competitivo, no competitivo e irreversible.

También ha sido de gran interés para el profesor Patil la farmacología y la toxicología ocular. Este hecho lo demuestra la publicación del libro: **Una Introducción a la Farmacología y Toxicología Ocular (*An Introduction to Ocular Pharmacology and Toxicology*)**, en colaboración con el Dr. Allan M. Burkman en el año 2000. El Dr. Patil ha investigado la interacción de medicamentos con la melanina, siendo de particular interés el hallazgo de la explicación de la duración prolongada de la midriasis producida por la atropina y medicamentos tópicos similares en animales y humanos con pigmentación del iris.

El Dr. Patil ha mostrado interés, el cual ha sido expresado en las correspondientes publicaciones, en la elucidación de las acciones farmacológicas de nuevas sustancias derivadas de plantas, particularmente los alcaloides isoquinolínicos de los géneros *Thalictrum* y *Delphinium* en colaboración con los doctores Jack L. Beal y Raymond Doskotch de la Facultad de Farmacia de la OSU. También acompañó al Dr. Beal como miembro de la Asociación Americana de Farmacognosia. El Dr. Patil tiene más de 150 publicaciones científicas sobre su investigación.

El Dr. Popat Patil ha sido reconocido por varias instituciones como docente y como investigador. Esos reconocimientos incluyen el Premio Miriam R. Balshone (1979) por la enseñanza de la farmacología y la terapéutica del sistema nervioso. Es miembro de la Sociedad Americana de Farmacología y Terapéutica Experimental (ASPET) y también de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia, En los años 1979 -1981 el Dr. Patil fue seleccionado como el Profesor Kimberly. En 1980, recibió el Premio Humboldt (Premio al Científico Senior) para investigación, en Alemania. Es Miembro Vitalicio de la Academia de Ciencias de Ohio y de la Asociación Von Humboldt de América. Además, ha sido electo a la Academia Emérita en la OSU.

El Doctor Popat Patil se jubiló en el año 2005, pero su producción académica no ha cesado. La publicación del libro ***Discoveries in Pharmacological Sciences*** (Descubrimientos en las Ciencias Farmacológicas, World Scientific, 2012) es una gran muestra de ello. Recientemente, en colaboración con el Profesor Emérito Robert Buerki, publicó el libro ***A History of Drug Sciences at The Ohio State***

University, College of Pharmacy (Una Historia de las Ciencias de los Medicamentos en la Facultad de Farmacia de la Universidad del Estado de Ohio; Lins Learning, 2019).

POPAT N. PATIL, Ph. D.

El Tutor

El Dr. Patil ha sido Tutor de varios farmacólogos de renombre, entre los cuales se destacan: Richard J. Seidehamel, Louis De Sanctis, Robert Ruffolo y María Margarita Salazar-Bookaman.

Nuestra experiencia con el Dr. Patil ha sido enriquecedora, implicaba trabajar con un Tutor muy exigente que pensaba que nada es más importante que la investigación y la ciencia. Dentro de las exigencias del Dr. Patil estaba que tenías que estar en el laboratorio para cuando él llegara, exactamente a las 9:00 am, y debías presentarle el plan de trabajo del día. A las 5:00 pm, tenías que ir a su oficina para reportar los resultados del día. Si por alguna razón todavía no había resultados, tenías que dar una explicación de por qué no había resultados para reportar. Él estaba allí aun los sábados y, por supuesto, tú también debías estar. El resultado fue que terminamos nuestros estudios de Doctorado en un tiempo relativamente corto, 3 años y 11 meses. Aún más, presentar un trabajo en una reunión científica significaba preparar el resumen a enviar, hacer la presentación y ensayarla con él hasta que se consideraba perfecta, incluyendo el tiempo para las preguntas, ya fuera una presentación en ASPET o en un congreso internacional de Farmacología. ¿Qué hemos obtenido a través de todos estos años? La mejor formación en la investigación en farmacología y los más bellos

reconocimientos académicos que hemos tenido en nuestra vida. Cronológicamente, en 1976, fuimos reconocidas con el Premio al Estudiante Graduado Líder (*Graduate School Leadership Award*), cuyas bases consideran el trabajo hecho para la Universidad y para la Comunidad. El Dr. Patil al conocer lo del Premio, simplemente me hizo una pregunta "¿Ese premio se debe a algún logro científico?" ¡Ni una felicitación, en absoluto!! Posteriormente, recibimos el Premio *Jack L. Beal Postbaccalaureate Alumni Award* y luego el mayor honor de todos, la creación del Premio María Margarita Salazar-Bookaman a la Mejor Tesis Doctoral en el Área de Receptores en el año 2012.

Las publicaciones son otra cosa. El primer trabajo que mandamos a publicar lo hicimos a *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (JPET)*. Casi lloré cuando leímos todos los comentarios de los árbitros; por supuesto, no estábamos acostumbrados a eso, pero el Dr. Patil, sí. Él nos aconsejó que tuviera paciencia y mejoráramos el artículo, pero, de nuevo, él tenía la última palabra en las correcciones. Aún hoy, esto sigue igual, tal y como sucedió con nuestra publicación de 2023, titulada *Pharmacological and Related Implications of Drug Accumulation by Melanins*, by Salazar-Bookaman Maria Margarita and Popat N Patil, en *Arch Phar & Pharmacoi Res.* 3(4): 2023. Hasta el presente, nuestros estudios acerca de la interacción de fármacos con melanina han resultado en 8 presentaciones a congresos, 13 publicaciones y 1 capítulo de libro. Este último en colaboración con el Doctor Norman Uretsky. Esto aunado a mi Tesis Doctoral titulada *Significance of the Interaction of Drugs with Melanin* (Significado de la Interacción de Fármacos

con la Melanina), The Ohio State University, Columbus, Ohio, Estados Unidos de Norte América, 1976. Así, desde 1976 hemos estado trabajando con el Dr. Patil y el Dr. Dennis Feller por 52 años.

Todo ello ha llevado a que en lugar de llamarlo Profesor Patil, se le dé el título que él bien merece que es **Maestro Patil**. Eso es lo que él es, un **Maestro** en el arte de enseñar tanto a estudiantes de pregrado como de postgrado. Y como Tutor, su respeto por la opinión de los estudiantes va más allá de lo usual. Compartir el conocimiento entre un Tutor y un estudiante no es fácil, para el Dr. Patil es un arte.

Profesor y padre

¿Porqué ponemos juntos profesor y padre de familia? Lo hacemos porque para nosotros trabajar con el Doctor Partil nos hizo sentir como adoptada y formar parte de su grupo de laboratorio y en la familia Patil. Observar al Dr. Patil cuidando sus hijos y nietos, por supuesto apoyado por su esposa Betty, es algo muy importante ya que además de trabajar en sus obligaciones como profesor, demostró que se toma tiempo para llevar a sus hijos y nietos por la senda de importantes valores humanos y morales, tan necesarios en todas partes y siempre.

El Doctor Robert Ruffolo (Bob) describe su experiencia con el Dr. Patil como Tutor desde el pregrado hasta la obtención de su Ph.D.

Me siento feliz de escribir sobre el Dr. Patil. Es un hombre maravilloso y un extraordinario científico y fue la persona más importante que cambió mi vida. Lo conocí hace 56 años, 1968. Fue durante mi primer semestre en la Universidad del Estado de Ohio (Ohio

State). Me había inscrito en el programa Pre-farmacia y había sido asignado al Dr. Patil como estudiante de pregrado, mi Tutor de Pregrado y se requería que me reuniera con él para que se asegurara que yo estaba haciendo lo requerido para entrar a estudiar Farmacia. Cuando llegué a su oficina vi a un hombre humilde, tranquilo y quien se presentó como Popat Patil. Después que aprobó mis cursos pre-farmacia le dije que, aunque yo quería estudiar Farmacia mi deseo era hacer el postgrado y hacerme científico, particularmente un farmacólogo. Me dijo que él era farmacólogo, y que si yo quería ser farmacólogo podía trabajar en su laboratorio todos los días después de clase. Inmediatamente dije que si y esto me llevó a una relación de 10 años de trabajo y tutoría, desde los estudios de pregrado hasta culminar los estudios de postgrado. Con ello obtuve una carrera exitosa como farmacólogo y ejecutivo senior en algunas de las compañías farmacéuticas más grandes y famosas del mundo.

Durante mi estancia de 10 años en Ohio State en el laboratorio del Dr. Patil, recibí la mejor educación posible y el entrenamiento provenientes de él y otros profesores de la Facultad de Farmacia, en todos los aspectos de la farmacología, desde los genes hasta los humanos. Fue este excelente entrenamiento el que me permitió establecer mi carrera independiente. Este entrenamiento no involucra farmacología solamente, sino también muchos aspectos prácticos y personales de ser un científico y que no se aprende en los libros. También se constituyó en uno de mis modelos a seguir como hombre joven.

Estuve muy orgulloso de trabajar con el Dr. Patil, no solamente porque que es un ser humano verdaderamente decente, sino que también un farmacólogo establecido e

internacionalmente reconocido. Su trabajo fundamental en la compleja estereoquímica de los diasterómeros de la efedrina a finales de los años 60s, que todavía es altamente citada. El Dr. Patil también es reconocido como una autoridad en los receptores adrenérgicos. Su uso temprano de la proporción isomérica (isomeric ratio) fue fundamental en la clasificación y subclasificación de los receptores, particularmente los adrenérgicos, lo cual es una contribución novedosa y significativa a la farmacología.

Durante los años 1970s, el Dr. Patil comenzó una extensa serie de investigaciones sobre los aspectos estéricos de los fármacos adrenérgicos que involucraban la definición de los requisitos de los agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos. Él hizo una extensa evaluación de los agonistas directos de los receptores adrenérgicos como la noradrenalina, los cuales son los fármacos que activan directamente a los adrenoceptores uniéndose al receptor. Además, también caracterizó los requisitos estereoquímicos de las aminas simpaticomiméticas indirectas tales como la anfetamina. Definió en detalle los requisitos configuracionales de los adrenoceptores para los fármacos enantioméricos que tienen uno o más centros asimétricos, así como los requisitos conformacionales que son óptimos para la actividad farmacológica de los adrenoceptores, así como también los transportadores neuronales de la recaptación.

El Dr. Patil también estableció que en la actividad de las aminas simpaticomiméticas indirectas estaban involucrados dos mecanismos diferentes de recaptación. Uno para aquellos fármacos que contenían grupos hidroxilos en el anillo bencénico (fenólicos) y otro proceso diferente para

aquellos fármacos que no poseen un grupo hidroxilo aromático. Este fue un hallazgo altamente novedoso.

También fue durante los años 1970s que el Dr. Patil comenzó a trabajar con la Dra. Margarita Salazar en relación con la farmacología ocular y el impacto que el pigmento melanina tiene sobre la acción de los fármacos. La melanina tiene la capacidad de unirse a muchos fármacos con moderada afinidad y alta capacidad. Estos estudios llevaron a una más completa comprensión de la interacción de una variedad de fármacos, incluyendo las aminas simpaticomiméticas en el ojo. Es muy importante que ellos demostraron cómo la presencia de la melanina puede tener impacto sobre la magnitud y la duración del efecto de estos fármacos en el ojo.

En los años 1980s hasta los 1990s, el Dr. Patil comenzó una serie de investigaciones sobre los agonistas de los receptores adrenérgicos llamados imidazolininas. Las imidazolininas eran conocidas como agonistas adrenérgicos y se usaban terapéuticamente como descongestionantes nasales debido a su capacidad para estimular los receptores alfa-adrenérgicos en la mucosa nasal. Las imidazonlininas eran conocidas desde los años 1930s pero sus efectos no habían sido investigados en detalle en los receptores alfa hasta los estudios del Dr. Patil. Él y sus colaboradores demostraron que, aunque las fenetilaminas y las imidazolininas estimulan los mismos receptores adrenérgicos y ambos fármacos son bloqueados por los mismos antagonistas con las mismas constantes de disociación, ellas interactúan en forma muy diferente con los receptores alfa-adrenérgicos. Por ejemplo, el Dr. Patil demostró que había una falta de desensibilización cruzada

entre las fenetilaminas y las imidazolininas. Cuando los receptores alfa-adrenérgicos estaban completamente desensibilizados a las imidazolininas las fenetilaminas todavía podían producir respuestas máximas. Y, finalmente, el grupo beta-hidroxilo que era esencial para la actividad de los agonistas de la fenetilamina era irrelevante con respecto a la acción de las imidazolininas, los cuales no requerían el grupo beta-hidroxilo.

Posteriormente en su carrera, el Dr. Patil se interesó en la historia de la farmacología tanto global como específicamente en Ohio State. Escribió varios libros y publicaciones para hacer un tributo al campo de la ciencia que él ha amado y al cual ha contribuido tan extensamente por casi siete décadas.

El Dr. Patil ha dedicado su vida a su familia, a la farmacología, a incontables estudiantes de farmacia y estudiantes de postgrado y a los farmacólogos a través del mundo. Ha tenido un significativo impacto en su campo de investigación y también en mí, y fue el Dr. Patil quien impactó más significativamente en mi carrera. Siempre estaré en deuda con él por todo lo que ha hecho por mí. Nunca lo olvidaré.

El Doctor Popat Patil y su relación con los estudiantes de postgrado

Profesor – Alumna

Doctora Tatiana González - Cestari

La Doctora Tatiana González-Cestari, en su condición de estudiante de Doctorado, nos muestra la calidad científica y humana del Dr. Patil.

Conocí al Dr. Patil en el año 2005, cuando yo era estudiante del Postgrado de

Farmacología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y realizaba investigaciones para mi Tesis Doctoral en la Universidad del Estado de Ohio (OSU, por sus siglas en inglés). Desde el primer día, el Dr. Patil me trató como una aprendiz y su familia fue muy cálida y acogedora. Desde mis inicios en OSU, apoyó el trabajo que acababa de comenzar a hacer en el laboratorio del Dr. Dennis McKay. Supongo que también ayudó el hecho que llegué a OSU con buenas referencias de la Dra. Margarita Salazar, una de las exalumnas del Dr. Patil.

Muchos pueden decir que conocí una versión del Dr. Patil que era muy diferente a la de años anteriores, lo cual probablemente sea cierto, pero incluso este científico “más relajado” me enseñó muchas cosas que me han ayudado a dar forma a mi investigación, mi carrera y mi vida personal.

Dentro o fuera de la Facultad de Farmacia, el Dr. Patil siempre estuvo disponible para intercambiar ideas y evaluar varios puntos de vista, para ayudarnos (a estudiantes, a profesores y al personal) a hacer conexiones y establecer contactos para guiar nuestro crecimiento profesional, para defendernos y hasta patrocinarnos como una buena figura paternal. Su experiencia y conocimiento se extienden mucho más allá de él mismo porque ha compartido toda esa riqueza desinteresadamente con cualquier persona con la que interactúa. Siempre estaba de buen humor... tal vez porque estaba listo para jubilarse como me dijo una vez... pero lo dudo.

Su capacidad para detectar oportunidades y hacerlas realidad es algo que admiro y trato de imitar. A menudo me recordaba que muchas veces lo simple es mejor, y que la Farmacología clásica todavía puede

estar de moda. Pero incluso con todo ese conocimiento y éxitos profesionales y personales, siempre nos ha tratado como iguales. En todo momento tuvo la humildad de venir a nosotros, los estudiantes, para revisar su trabajo en el laboratorio, sus manuscritos para artículos de investigación e incluso su libro.

Además de ser un ejemplo profesional, el Dr. Patil me ha inspirado a vivir una vida más saludable física y mentalmente. Después de todo, ¿quién no querría envejecer para ser tan activo y tener una mente tan aguda como el Dr. Patil?

Unos meses después de interactuar con él casi todos los días, él se enteró que conocía a mi abuelo materno, el Dr. Antonio Muskus, ya que ambos pertenecían a la comunidad de Farmacología. Creo que esto ayudó a consolidar nuestra relación como el casi abuelo o "profesor abuelo" que es para mí.

Me mudé a Florida desde Ohio hace ocho años y una de las cosas que extraño de Columbus es tener conversaciones con el Dr. Patil y aprender de él tal como lo hice durante doce años.

Profesor - Profesor

Dennis R. Feller

El Dr. Dennis Feller, profesor de la Facultad de Farmacia en la OSU por 26 años le habla al Dr. Patil como su compañero.

Tu presencia en la División de Farmacología jugó un papel significativo en mi aceptación de un cargo de profesor en 1969. Fui a Ohio State con tus artículos del *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* y un artículo de revisión sobre

receptores adrenérgicos a la mano que estaban estrechamente relacionados con el trabajo que yo estaba haciendo sobre tejido adiposo para mi Tesis Doctoral.

Fue un tiempo extraordinario para estar en una División altamente comprometida con la enseñanza a estudiantes de pre- y postgrado, y con el desarrollo de programas de investigación. La camaradería de los profesores en nuestra División era excelente. Tú suministrabas el mayor liderazgo y excelencia en investigación en nuestra División.

Durante los siguientes 26 años nuestras colaboraciones interdisciplinarias con colegas en Farmacología y en Química Medicinal se convirtieron en el tiempo más productivo y exitoso. Creo que tú y yo estábamos en el Comité de Investigación de virtualmente cada uno de nuestros estudiantes de postgrado. Muchos de los estudiantes que nosotros entrenamos han tenido una carrera muy exitosa. Necesito agradecerte por tu valiosa Tutoría para mí y mis estudiantes de postgrado y mis post-doctorantes en Ohio State y en la Universidad de Mississippi. Estoy feliz de haber sido parte de la División de Farmacología por tantos años.

Posteriormente en tu carrera te has dedicado a la ardua tarea de publicar libros sobre la Historia de la Farmacología en la India, Historia de la Ciencia de los Medicamentos en la Facultad de Farmacia, el Desarrollo de las Ciencias Farmacológicas en la Universidad del Estado de Ohio y los Descubrimientos en las Ciencias Farmacológicas. Estos libros proveen la necesaria documentación de las contribuciones de los profesores y los científicos de nuestra Facultad, nuestra Universidad y aquellos farmacólogos

alrededor del mundo. Gracias por tu excelente contribución a la historia de nuestra disciplina,

Licenciada Jessica Carvajal Moreno, estudiante de nuestro Postgrado de Farmacología y tesista del Doctor Jack Yalovich y la suscrita, opina sobre la condición científica y humana del Dr. Patil.

El Dr. Popat Patil ha tenido un impacto profundo y transformador en mi proyecto de investigación. Al principio, mi idea era poco más que una noción indefinida, un interés sin dirección. Sin embargo, fue el apoyo y la guía del Dr. Patil lo que despertó en mí una verdadera pasión por la investigación. Con su ayuda, tuve la oportunidad de conocer a algunos de los mentores más influyentes de la Escuela de Farmacia de la Universidad del Estado de Ohio, quienes enriquecieron mi perspectiva y comprensión.

El Dr. Patil no solo me brindó las herramientas y el conocimiento necesarios para avanzar, sino también la confianza para llegar a un nivel que nunca imaginé alcanzar. Cada conversación, cada consejo y cada desafío que me planteó me ayudaron a profundizar y perfeccionar mi trabajo, permitiéndome descubrir mi propio potencial. En muchas ocasiones, me alentó a ser crítica, a no conformarme, y a esforzarme siempre por dar un paso más allá. Gracias a su influencia, desarrollé una visión más clara de mi futuro y una confianza firme en mis propias habilidades.

Hoy, reconozco que mi proyecto de investigación no habría sido posible sin el impulso, la motivación y la inspiración que recibí del Dr. Patil. Su apoyo ha transformado mi forma de ver la educación,

la investigación y, en última instancia, a mí misma.

A sus 90 años, recién cumplidos, el Dr. Patil sigue pendiente de la investigación, los estudiantes, las publicaciones y, en síntesis, de la farmacología.

Me gustaría finalizar esta semblanza del Dr. Patil transcribiendo una dedicatoria que él me envió con su libro *Discoveries in Pharmacological Sciences*, que muestra la forma como el describe al farmacólogo o a la Farmacología:

“Querida Margarita,

Desde mi visita a Venezuela hemos vivido una gran aventura en Farmacología. Fue una delicia descubrir la causa de la prolongada duración de la acción midriática de la atropina, el misterioso efecto fue bien dilucidado. ¡¡Felicitaciones!!

Disfruta el trabajo académico y trasmite los valores educacionales con el estímulo a las próximas generaciones”,

Popat Patil,

Junio 26, 2012, OSU, Columbus, Ohio



Metabolitos secundarios mayoritarios de las hojas de *Antidaphne viscoidea* Poepp. & Endl. (Santalaceae)

Major secondary metabolites from *Antidaphne viscoidea* Poepp. & Endl. leaves (Santalaceae)

KATIUSKA CHÁVEZ^{*1}, GUIDMAR DONALLE^{**}, STEPHEN TILLET^{†***}, ALÍRICA I. SUÁREZ^{*2}

Resumen

Se presentan los resultados del primer estudio fitoquímico de la especie *Antidaphne viscoidea* Poepp. & Endl. (Santalaceae) colectada en Venezuela. A partir del extracto metanólico de las hojas de la planta se obtuvieron diferentes fracciones, las cuales fueron separadas mediante técnicas cromatográficas, dando como resultado el aislamiento y purificación de cinco compuestos que se identificaron como: una mezcla de los isómeros (+)-catequina (**1**) y (-)-catequina (**2**), el compuesto fenólico 4-hidroxi-3-metoxifenil-β-D-glucopiranosido (**3**), quercitrina (**4**) y el triterpeno β-sitosterol (**5**). Todos estos compuestos se reportan por primera vez para esta especie y fueron caracterizados e identificados mediante RMN de ¹H y ¹³C en una y dos dimensiones y por comparación de los datos reportados en la literatura.

Palabras clave: *Antidaphne*, Santalaceae, hemiparásita, muérdago, fitoquímica, metabolitos secundarios

Abstract

The results of the first phytochemical study of the species *Antidaphne viscoidea* Poepp. & Endl. (Santalaceae) collected in Venezuela are presented. Various fractions were obtained from the plant's leaf's methanolic extract, which were subsequently separated using chromatographic techniques. This process resulted in the isolation and purification of five compounds, identified as a mixture of the (+)-catechin (**1**) and (-)-catechin (**2**) isomers, the phenolic compound 4-hydroxy-3-methoxyphenyl-β-D-glucopyranoside (**3**), quercitrin (**4**), and the triterpene β-sitosterol (**5**). These compounds are reported for the first time in this species and were characterized and identified through one- and two-dimensional ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopy, as well as by comparison with previously reported data in the literature.

Keywords: *Antidaphne*, Santalaceae, hemiparasite, mistletoe, phytochemistry, secondary metabolites

*Unidad de Productos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. **Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ***Herbario Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Correspondencia: katiuska.chavez@ucv.ve

Orcid: [10000-0003-4103-9799](https://orcid.org/0000-0003-4103-9799)

[20000-0002-3317-5179](https://orcid.org/0000-0002-3317-5179)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.4](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.4)

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

Recepción: 26/08/2024

Aprobación: 09/10/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 159-170. 2024

Introducción

Antidaphne Poepp. & Endl. es un género de plantas aéreas hemiparásitas conocidas como muérdagos (Caraballo-Ortiz y Morales-Pérez, 2018), descrito por primera vez por Poeppig y Endlicher en 1838 (Kuijt, 1988) y comprende nueve especies distribuidas en el Neotrópico (GBIF, 2023; POWO, 2024). Desde su descubrimiento, este género ha sufrido varios cambios en su clasificación taxonómica. Al inicio, fue ubicado dentro de la familia Loranthaceae (Kuijt, 1965; Kuijt, 1968; Rizzini, 1982; Casale, 1990), luego en la familia Eremolepidaceae (Kuijt, 1988; Kuijt, 1998) y, más recientemente, con información obtenida de estudios de análisis filogenético molecular, se incluyó dentro de la familia Santalaceae (Nickrent y Duff, 1996; Der y Nickrent, 2008; Nickrent y col., 2010; González y col., 2021; GBIF, 2023).

La familia Santalaceae, conocida como la familia del sándalo, incluye alrededor de 44 géneros y más de 1000 especies (Christenhusz y Byng, 2016), distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Killeen y col., 1993; Der y Nickrent 2008; Nickrent y col., 2010). Las especies de Santalaceae son hierbas, arbustos o árboles, en su mayoría hemiparásitas de raíz, es decir, plantas que obtienen agua y sales minerales desde otra planta, pero suelen tener clorofila y realizan fotosíntesis, lo que les permite generar materia orgánica para alimentarse, siendo parcialmente parásitas.

Una de las especies más utilizada de esta familia es *Santalum album* L., ya que posee una madera blanca aromática de la cual se extrae el aceite de sándalo. Debido a su fragancia, se utiliza en formulaciones de muchos productos como incienso, perfumes,

cosméticos, jabones y como ingrediente de sabor en la industria alimentaria. Su uso se remonta a 4000 años, por lo que su incienso es el más antiguo (Killeen y col., 1993; Choudhary y Chaudhary, 2021; Anmol y col., 2024). El aceite de sándalo ha sido ampliamente estudiado y se ha reportado como componentes mayoritarios los alcoholes sesquiterpénicos α - y β -santalol. También se ha reportado la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos grasos y fenilpropanoides (Bisht y Kumar, 2021; Sharifi-Rad y col., 2022). Además de su relevancia en perfumería y cosmética, el sándalo y su aceite han mostrado una amplia gama de actividades farmacológicas que validan sus usos terapéuticos tradicionales (Kumar y col., 2015; Pullaiah y col., 2021; Sharifi-Rad y col., 2022).

Otras especies de esta familia que han sido motivo de diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos son las pertenecientes al género *Thesium* L., el más grande de la familia Santalaceae. Una revisión realizada por Lombard y col. (2020) resalta el importante papel que desempeñan las especies de este género en distintas comunidades a nivel mundial, el cual se evidencia por los numerosos usos etnobotánicos y las actividades farmacológicas reportadas. Su composición química comprende principalmente flavonoides y otros compuestos fenólicos, ácidos grasos, terpenos y alcaloides. *Thesium chinese* es la especie más utilizada del género; los estudios farmacológicos han demostrado que posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacterianas (Li y col., 2021; Liu y col., 2023; Wei y col., 2023).

La especie *Antidaphne viscoidea* Poepp. & Endl. es un arbusto epífita, hemiparásito, de color verde o verde rojizo (Morales,

2015), que se encuentra en México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Venezuela, Guyana y Brasil. En Venezuela se centra en los estados Miranda, Aragua, La Guaira, Carabobo, Táchira, Mérida, Trujillo, Yaracuy y Bolívar (GBIF, 2023). Suele encontrarse parasitando diferentes familias de árboles; entre los hospederos se han señalado especies de las familias Betulaceae, Ericaceae, Myrtaceae, Moraceae, Fabaceae, Lauraceae, Hamamelidaceae, Fagaceae y Elaeocarpaceae (Morales, 2015). Al ser hemiparásita, obtiene agua y nutrientes a través de conexiones haustoriales con la planta huésped provocando daños y produciendo efectos de competencia perjudiciales al hospedero ya que reduce la intensidad del proceso fotosintético e incrementa la transpiración (Torres y Barrera, 1997), por ello, las hemiparásitas son conocidas comúnmente como “matapalo” o “injerto” (Vera y col., 2014).

La revisión de la literatura revela escasa evidencia científica sobre estudios realizados con especies del género *Antidaphne*. En el caso de *A. viscoidea*, Mejía y col. (2019), reportan el uso de la decocción de las partes aéreas de esta planta en la medicina tradicional de Colombia para tratar la hipercolesterolemia. En otro trabajo realizado también en Colombia por Niño y col. (2011) se reportan los resultados de un screening fitoquímico por cromatografía de capa fina, donde se determinó la presencia de taninos y saponinas en el extracto de H₂O-MeOH de las hojas y ramas de esta especie. Adicionalmente, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de n-hexano, diclorometano y H₂O-MeOH, determinándose para este último un porcentaje de actividad de 13% (Niño y col., 2011).

Como se mencionó, *A. viscoidea* es una especie americana. Los pocos estudios fitoquímicos y biológicos realizados a esta planta en conjunto con los antecedentes reportados para otras especies hemiparásitas de Santalaceae, llevó a realizar la presente investigación con el fin de aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios en las hojas de esta planta y contribuir de esta forma al conocimiento de esta especie.

Materiales y Métodos

MATERIAL VEGETAL

La planta *Antidaphne viscoidea* Poepp & Endl, hemiparásita sobre *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), fue colectada e identificada por el Dr. Stephen Tillett en San Diego de los Altos, estado Miranda, Venezuela, el 14 de octubre de 2015. Una muestra de colección se encuentra en el Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad central de Venezuela, bajo el número MYF 29330.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

Una vez colectada la planta, se dejó secar a temperatura ambiente por 15 días. Se separaron las hojas, los tallos y las inflorescencias. Las hojas secas (240 g) fueron molidas y se colocaron en maceración con metanol (MeOH), posteriormente, se filtró el extracto y se evaporó el solvente hasta sequedad. El extracto obtenido (21,14 g) fue disuelto en 160 mL de una mezcla MeOH:H₂O (50:50) y se realizaron sucesivas particiones con solventes en orden creciente de polaridad, comenzando con n-hexano, CH₂Cl₂ y por

último AcOEt. Cada una de estas fracciones fue desecada con $MgSO_4$ anhidro, luego filtrada y concentrada a sequedad. Las fracciones orgánicas fueron separadas mediante cromatografía en columna usando sílica gel. Como fase móvil se emplearon solventes orgánicos puros o mezclas de ellos. Los eluatos obtenidos fueron monitoreados por medio de cromatografía de capa fina (CCF) y se unieron según criterios de R_f y coloración al revelado con *p*-anisaldehído/ H_2SO_4 /AcOH. Los compuestos aislados fueron caracterizados por métodos espectroscópicos de IR y RMN de 1H y ^{13}C , en una y dos dimensiones, y comparación con datos reportados en la literatura (Figura 1).

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y son reportados sin corrección. Los espectros de RMN fueron tomados en un espectrómetro ECLIPSE-JEOL 270 MHz en $CDCl_3$, CD_3OD y $DMSO-d_6$.

Los análisis de CCF fueron realizados en placas de aluminio de sílice gel Macherey-Nagel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ reveladas con *p*-anisaldehído/ H_2SO_4 /AcOH. Para cromatografía en columna se utilizó sílica gel G60 (70-230 mesh ASTM Scharlau).

(+)-catequina ((2R,3S)-5,7,3',4'-tetrahidroxilflavan-3-ol) (1) y (-)-catequina ((2S,3R)-5,7,3',4'-tetrahidroxilflavan-3-ol) (2)

Sólido blanco, p.f. 96-99 °C. (395,7 mg, 19.2 % de la fracción de AcOEt). RMN 1H (270 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm: 4.48 (2H, d, $J=7.4$, H-2); 3.82 (2H, m, H-3); 2.35 (2H, dd, $J=15.8, 7.9$, H-4 α); 2.65 (2H, dd, $J=15.8, 5.2$, H-4 β); 5.89 (2H, s, H-6); 5.69 (2H, s, H-8); 6.72 (2H, s, H-2'); 6.70 (2H, d, $J \sim 8.1$, H-5'); 6.59 (2H, d, $J=8.1$, H-6'). RMN ^{13}C (67.5 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm: 81.5, 81.7 (C-2); 66.8, 67.0 (C-3); 28.4 (2C, C-4); 157.0 (2C, C-5); 94.4, 94.6 (C-6); 156.7 (2C, C-7); 95.7, 95.9 (C-8); 155.9 (2C, C-9); 99.7

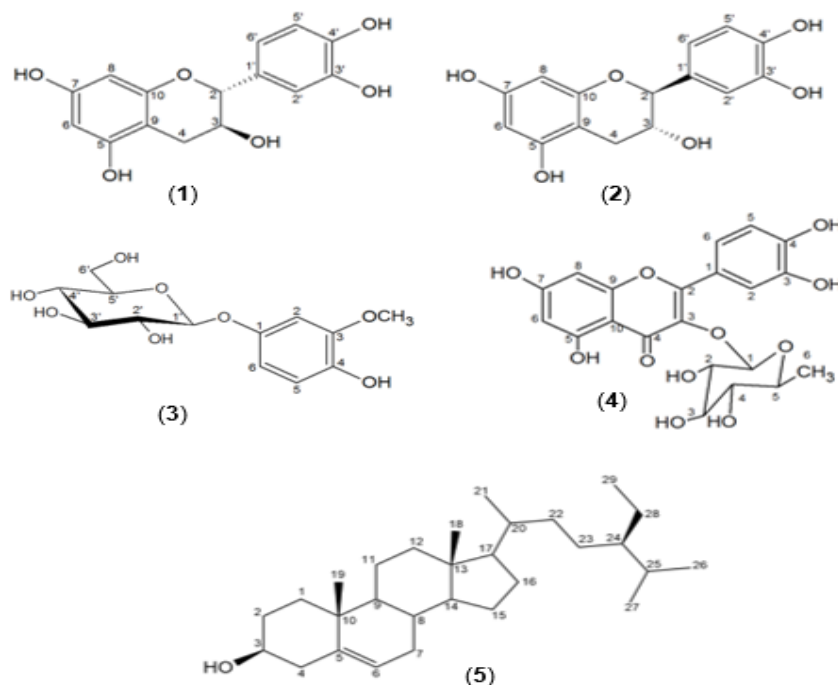


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados de las hojas de *Antidaphne viscoidea*

(2C, C-10); 131.2 (2C, C-1'); 115.6, 115.8 (C-2'); 145.4 (4C, C-3', C-4'); 115.0, 115.2 (C-5'); 118.9, 119.1 (C-6').

4-hidroxi-3-metoxifenil- β -D-glucopiranosido (3)

Líquido viscoso de color marrón oscuro, (48,3 mg, 2,3 % de la fracción de AcOEt). RMN ^1H (270 MHz, MeOD) δ ppm: 6.79 (d, $J=2.2$, H-2); 6.69 (d, $J=8.1$, H-5); 6.58 (dd, $J=8.6, 2.2$, H-6); 4.75 (d, $J=7.2$, H-1'); 3.44 (m, H-2'); 3.39 (m, H-3'); 3.42 (m, H-4'); 3.39 (m, H-5'); 3.87 (m, H-6'); 3.69 (dd, $J=11.2, 6.1$, H-6'); 3.81 (s, O-CH₃). RMN ^{13}C (67.5 MHz, MeOD) δ ppm: 151.5 (C-1); 102.4 (C-2); 148.0 (C-3); 141.7 (C-4); 114.8 (C-5); 108.9 (C-6); 102.8 (C-1'); 73.7 (C-2'); 76.8 (C-3'); 70.3 (C-4'); 76.8 (C-5'); 61.4 (C-6'); 55.3 (O-CH₃).

Quercitrina (4)

Sólido de color amarillo p.f. 178-180 °C, (25,0 mg, 1,2% de la fracción de AcOEt). RMN ^1H (270 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 6.07 (s, H-6); 6.25 (s, H-8); 7.28 (s, H-2'); 6.83 (d, $J=8.4$, H-5'); 7.23 (m, H-6'); 5.26 (s, H-1''); 3.59 (m, H-2''); 3.57 (m, H-3''); 3.31 (m, H-4''); 3.51 (m, H-5''); 0.81 (d, $J=5.9$, H-6''). RMN ^{13}C (67.5 MHz, DMSO-d₆) δ ppm: 157.1 (C-2); 134.4 (C-3); 177.7 (C-4); 161.7 (C-5); 100.2 (C-6); 164.4 (C-7); 94.7 (C-8); 157.3 (C-9); 103.3 (C-10); 121.0 (C-1'); 116.1 (C-2'); 146.1 (C-3'); 149.8 (C-4'); 116.1 (C-5'); 121.5 (C-6'); 102.4 (C-1''); 71.0 (C-2''); 71.1 (C-3''); 71.0 (C-4''); 71.9 (C-5''); 18.1 (C-6'').

β -sitosterol (5)

Cristales blancos p.f. 133-136 °C, (13,2 mg, 0,63 % de la fracción de hexano). RMN ^1H (270 MHz, CDCl₃) δ ppm: 3.51 (m, H-3); 5.36 (d, $J=5.4$, H-6); 0.98 (s, H-18); 0.66

(s, H-19); 0.90 (d, $J=6.4$, H-21); 0.80 (m, H-26); 0.80 (m, H-27); 0.80 (m, H-29). RMN ^{13}C (67.5 MHz, CDCl₃) δ ppm: 37.4 (C-1); 31.8 (C-2); 71.9 (C-3); 42.4 (C-4); 140.9 (C-5); 121.7 (C-6); 31.8 (C-7); 32.0 (C-8); 50.3 (C-9); 36.6 (C-10); 21.2 (C-11); 39.9 (C-12); 42.4 (C-13); 56.9 (C-14); 24.8 (C-15); 28.3 (C-16); 56.2 (C-17); 12.0 (C-18); 19.4 (C-19); 36.2 (C-20); 19.1 (C-21); 34.1 (C-22); 26.4 (C-23); 46.0 (C-24); 29.4 (C-25); 19.8 (C-26); 18.8 (C-27); 23.2 (C-28); 11.9 (C-29).

Resultados y Discusión

Los compuestos (1) y (2) se aislaron de la fracción de AcOEt como un sólido de color blanco soluble en MeOH. En CCF se observó una sola mancha que al ser revelada con *p*-anisaldehído-ácido sulfúrico da una coloración rojo intenso y un $R_f = 0,35$ al ser eluída en una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (86:14) sobre sílica gel 60. El espectro de RMN ^1H indicó que se trataba de un compuesto tipo flavonoide, lo cual se confirmó al analizar el espectro de RMN ^{13}C . La presencia de una señal a 28.4 ppm correspondiente a un grupo metileno y la ausencia de la señal de grupo carbonilo a campo bajo, señaló que se trataba de un compuesto tipo flavanol (flavan-3-ol), de los cuales los más comunes son las catequinas. Adicionalmente, se pudo apreciar que la mayoría de las señales se encontraban duplicadas, lo que hizo suponer que se trataba de un dímero o de una mezcla de dos isómeros. Analizando el espectro de RMN ^1H , se pudo observar la resonancia de cinco protones aromáticos. Dos de ellos aparecen como singletes integrando cada uno para dos protones, a desplazamientos de 5.69 y 5.89 ppm, típicos de los protones H-8 y H-6 en el anillo A de los flavonoides. Las

otras tres señales restantes se encuentran formando un sistema de espín ABX, en el cual una de las señales aparece como un doblete a 6.59 ppm (H-6', $J= 8.1$ Hz), por el acoplamiento con un protón cuya señal doblete centrada en 6.70 ppm (H-5') se solapa con un singlete a 6.72 ppm (H-2'). Debido a este solapamiento se hace difícil calcular la constante de acoplamiento de la señal del protón H-5' que debería estar alrededor de 8.1 Hz. A campo medio se distingue una señal doblete que integra para dos protones a un desplazamiento de 4.48 ppm (H-2, $J= 7.4$ Hz) y una señal multiplete que integra para dos protones a 3.82 ppm (H-3). Finalmente, a campo alto, se aprecia un conjunto de señales que indicaron la presencia de dos pares de protones diastereotópicos, por la aparición de dos dobletes de dobletes que integran cada uno para dos protones a desplazamientos químicos de 2.65 (H-4 α y H-4 β , $J=15.8, 7.9$) y 2,35 ppm (H-4 α y H-4 β , $J=15.8, 5.2$).

En el espectro de RMN ^{13}C se distinguieron un total de 21 señales, de las cuales, como ya se mencionó, muchas aparecen duplicadas o con intensidades dos o cuatro veces mayor a aquellas debidas a carbonos con la misma multiplicidad, sugiriendo que las señales de diferentes carbonos aparecen al mismo desplazamiento. A campo bajo se observaron cuatro señales de carbonos aromáticos oxigenados (157.0 (C-7), 156.7 (C-9), 155.9 (C-5) y 145.5 ppm (C-3' y C-4')). Las tres primeras señales se aprecian con el doble de intensidad que las señales de otros metinos, mientras que la última señal es cuatro veces más intensa, sugiriendo que estas cuatro señales se debían a un total de 10 carbonos. Adicionalmente, se observaron las resonancias de dos oximetinos (81.7 y 81.5 ppm para C-2; 67.0, 66.8 ppm para

C-3) y un metileno alifático a 28.4 ppm (C-4), que constituyen el anillo heterocíclico C en los compuestos de tipo flavan-3-ol. Las dos primeras señales aparecen duplicadas, al igual que otras a desplazamientos entre 119.1 y 94.4 ppm. La multiplicidad de todas las señales fue establecida a través de un experimento DEPT-135. El experimento en dos dimensiones HMQC, permitió determinar las correlaciones entre protones y carbonos directamente enlazados. En este espectro se aprecia claramente la correlación entre la señal del metileno en 28.4 ppm con los dobletes de dobletes a 2.65 y a 2.35 ppm. Debido a que las señales de protones diastereotópicos integran cada una para dos protones, se pudo determinar que se trataba de dos grupos CH_2 , lo cual indicó la presencia de una mezcla de dos compuestos isómeros tipo catequina. Las correlaciones entre protones y carbonos a dos y tres enlaces obtenidos a través del espectro HMBC, permitieron corroborar la estructura de los componentes de esta mezcla (Figura 2).

La molécula de catequina posee dos anillos bencénicos (denominados anillos A y B) y un heterociclo dihidropirano (anillo C) con un grupo hidroxilo sobre el carbono 3. Existen en la molécula dos centros quirales, uno se encuentra en el carbono

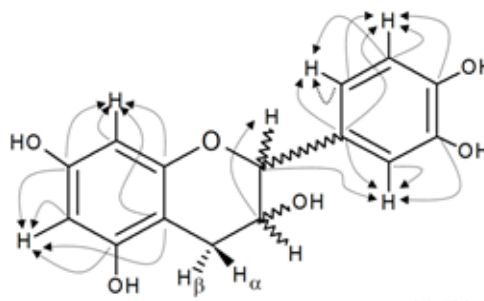


Figura 2. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para los compuestos 1 y 2

2 y el otro sobre el 3. Por lo tanto, la catequina posee cuatro diastereoisómeros. Dos son isómeros de configuración *trans* catequinas y los otros dos de configuración *cis* epicatequinas. El isómero más común de la catequina es la (+)-catequina. Su otro estereoisómero es la (-)-catequina o ent-catequina (Figura 3).

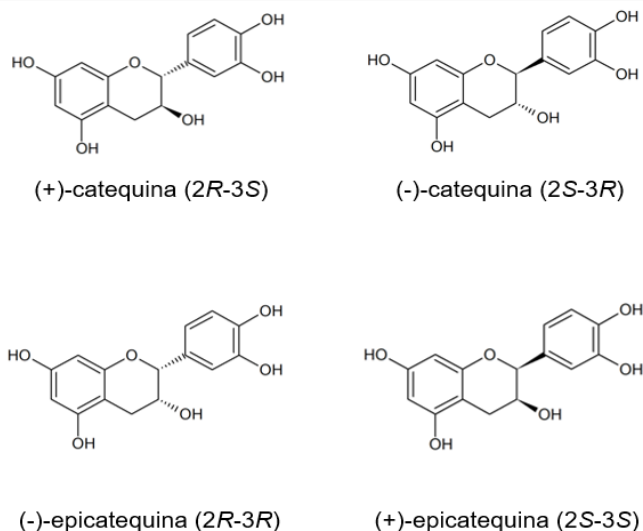


Figura 3. Estructuras de los diastereoisómeros de catequina

Con el fin de determinar cuáles de estos isómeros se encontraban presentes en la mezcla, se realizó una comparación entre los desplazamientos químicos de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , con los reportados en la literatura (Tablas I y II).

Cuando se comparan los desplazamientos de protones, se puede apreciar similitud entre los desplazamientos de la mezcla con los reportados para los isómeros (+) y (-)-catequina, en particular para los protones de los carbonos quirales C-2 y C-3, así como para los protones diastereotópicos del metileno C-4. Al comparar los desplazamientos químicos de los carbonos, la diferencia entre los datos experimentales y los datos de los cuatro compuestos es menor; sin embargo, para el

carbono C-2, se encuentra mayor similitud con los desplazamientos reportados para (+) y (-)-catequina.

Se procedió a medir el ángulo de rotación de la mezcla mediante el empleo de un polarímetro, sin embargo, no se observó rotación. Este resultado, en conjunto con los datos espectroscópicos obtenidos, nos llevó a proponer una mezcla de los enantiómeros (2R,3S)-5,7,3',4'-tetrahidroxilflavan-3-ol (1) y (2S,3R)-5,7,3',4'-tetrahidroxilflavan-3-ol (2), conocidos comúnmente como los isómeros (+)-catequina y (-)-catequina, respectivamente. Este tipo de compuestos se ha encontrado en algunas especies de *Santalaceae* como *Osyris quadripartita* (Kemal y col., 2022), *Osyris alba* (Al-Jaber y col., 2010), *Arceuthobium oxycedri* (Orhan y col., 2019), así como en otras especies hemiparásitas de *Loranthaceae* (Machado, 1995; Varela y col., 2001; Wagner y col., 2009; Kumar y col., 2023).

El compuesto (3) fue aislado de la fracción de AcOEt como un líquido altamente viscoso de color marrón oscuro. En CCF de fase normal se determinó un $R_f = 0,5$, al ser desarrollada en una mezcla de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (80:20), dando una coloración roja intensa al momento de ser revelada con *p*-anisaldehído. En el espectro de RMN ^1H , se observó un grupo de señales entre 6.56 y 6.79 ppm características de protones aromáticos. Al hacer una ampliación de esta zona, se observó una señal doblete a un desplazamiento químico de 6.79 ppm (H-2, $J=2.2$ Hz) debido al acoplamiento con un protón cuya señal aparece a 6.58 ppm como un doblete de doblete (H-6, $J=8.6$ y $J=2.2$ Hz). Otro doblete a 6.70 ppm (H-5, $J=8.2$ Hz) indicaron que la presencia de un sistema aromático tipo ABX. A un desplazamiento de 4.75 ppm se observó un doblete con una constante de acoplamiento

Tabla I.

Datos de RMN ¹H para la mezcla de compuestos **1** y **2**. Comparación con los datos reportados en la literatura para los isómeros de catequina

H	δppm Experimental ^A ¹ H (∫, m, J en Hz)	δppm Reportado ¹ H (∫, m, J en Hz)			
	Compuestos 1 y 2	(+)-Catequina ^B (Zhang y col., 2002)	(-)-Catequina ^C (Jung y col., 2008)	(-)-Epicatequina ^D (Cuong y col., 2019)	(+)-Epicatequina ^E (Martin y col., 2000)
2	4.48 (2H, d, 7.4)	4.48 (1H, d, 7.3)	4.48 (1H, d, 7.4)	4.73 (sa)	4.88 (1H, t, 0.73)
3	3.82 (2H, m)	3.81 (1H, m)	3,30 (1H, ddd, 5.2, 7.4, 12.9)	4.64 (1H, d, 4.5)	4.19 (1H, m)
4	2.35 (2H, dd, 15.8, 7.9) 2.65 (2H, dd, 15.8, 5.2)	2.35 (1H, dd, 15.9, 7.8, H-4α) 2.66 (1H, dd, 15.9, 4.8, H-4β)	2.65 (1H, dd, 16.0, 5.3, H-4α) 2.35 (1H, dd, 16.0, 8.0, H-4β)	2.68 (1H, dd, 4.5, H-4α) 2.48 (1H, dd, 16.5, H-4β)	2.74 (1H, dd, 16.60, 2.93, H-4α) 2.87 (1H, dd, 16.60, 2.93, H-4β)
6	5.89 (2H, s)	5.89 (1H, s)	5.89 (1H, d, 2.3)	5.88 (1H, d, 2)	6.02 (1H, d, 2.20)
8	5.69 (2H, s)	5.69 (1H, s)	5.69 (1H, d, 2.3)	5.72 (1H, d, 2)	5.92 (1H, d, 2.20)
2'	6.72 (2H, sa)	6.72 (1H, s)	6.72 (1H, d, 1.9)	6.88 (1H, sa, 8)	7.05 (1H, d, 1.95)
5'	6.70 (2H, d, 8.1)	6.68 (1H, d, 7.8)	6.69 (1H, d, 8.1)	6.66 (1H, d, 8)	6.78 (1H, d, 8.06)
6'	6.59 (2H, d, 8.1)	6.59 (1H, d, 7.8)	6.59 (1H, dd, 1.9, 8.1)	6.66 (1H, m)	6.83 (1H, dd, 1.95, 8.06)

DMSO-d₆: ^A270 MHz, ^B400MHz, ^C400MHz, ^D500MHz, Acetona-d₆: ^E500MHz

de 7.2 Hz, típica del protón anomérico de un sacárido. Finalmente, a campo alto se observa un singlete intenso con un desplazamiento químico de 3.81 ppm que integra para tres protones debida al grupo metoxi en la estructura. En el espectro de RMN ¹³C se observó un total de 13 señales, las cuales fueron discriminadas mediante un experimento DEPT-135 en: 3 carbonos cuaternarios, 8 metinos, 1 metileno y 1 metilo. A campo bajo se aprecian siete señales, de las cuales seis se atribuyen a carbonos aromáticos, siendo tres de ellos carbonos cuaternarios oxigenados (151.5, 148.0 y 141.7 ppm correspondientes a

C-1, C-3 y C-4, respectivamente). La señal a 102.8 ppm junto con las señales entre 76.8 y 70.3 ppm, confirman la presencia de un sacárido en la estructura y se determinó que se trata de una unidad de glucosa debido a la señal del metileno oxigenado en 61.4 ppm. Las correlaciones entre los carbonos y protones directamente enlazados fueron establecidas a través de un experimento HMQC. La elucidación estructural y la comparación de los datos experimentales con los reportados en la literatura, permitió identificar este compuesto como el 4-hidroxi-3-metoxifenil-β-D-glucopiranosido (Lin y Liu, 2010).

Tabla II.
 Datos de RMN ¹³C para la mezcla de compuestos **1** y **2**. Comparación con los datos reportados en la literatura para los isómeros de catequina

c	δ _c ppm Experimental ^A		δ _c ppm Reportado			
	Compuestos 1 y 2	DEPT-135	(+)-catequina ^B (Zhang y col., 2002)	(-)-catequina ^B (Jung y col., 2008)	(-)-epicatequina ^C (Cuong y col., 2019)	(+)-epicatequina ^D (Martin y col., 2000)
2	81.5 81.7	CH	81.0	81.3	78.1	79.3
3	66.8 67.0	CH	66.3	66.7	64.9	66.8
4	28.4 28.4	CH ₂	27.8	28.2	28.2	29.0
5	157.0 157.0	C	156.1	155.7	156.5	157.5
6	94.4 94.6	CH	95.1	95.4	95.2	96.1
7	156.7 156.7	C	156.4	156.8	156.2	157.4
8	95.7 95.9	CH	93.8	94.2	94.1	95.6
9	155.9 155.9	C	155.3	156.5	155.8	157.0
10	99.7 99.7	C	99.0	99.4	98.5	99.7
1'	131.2 131.2	C	130.6	130.9	130.6	132.1
2'	115.6 115.8	CH	114.5	114.9	114.9	115.1
3'	145.4 145.4	C	144.8	145.2	144.4	145.3
4'	145.4 145.4	C	144.8	145.2	144.5	145.2
5'	115.0 115.2	CH	115.0	115.4	114.8	115.4
6'	118.9 119.1	CH	118.4	118.8	118.0	119.2

DMSO-d₆,^A(67.5 MHz),^B(100MHz), ^C(500MHz); ^DAcetona-d₆, (125MHz)

El compuesto (4) fue aislado de la fracción de AcOEt como un sólido de color amarillo soluble en MeOH. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C presentaron un patrón de señales típico de un derivado de quercetina con un residuo de monosacárido. La comparación de los datos obtenidos con los reportados en la literatura para el compuesto 3-O-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, mostraron una gran similitud entre los datos, por lo que se concluyó que el compuesto (4) corresponde al metabolito secundario conocido comúnmente como quercitrina (Suárez y col., 2013).

Finalmente, el compuesto (5) fue aislado de la fracción de hexano como cristales blancos. En los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se identificaron señales típicas de una estructura triterpénica, por lo que se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de comparar los datos obtenidos con los reportados en la literatura para este tipo de compuestos, logrando identificar este metabolito como β -sitosterol (Kamal y col., 2016; Shwe y col., 2019).

Conclusiones

Se presentaron los resultados del primer estudio fitoquímico realizado a las hojas de la especie *Antidaphne viscoidea* Poepp. & Endl. (Santalaceae) colectada en Venezuela, que dio como resultado el aislamiento y purificación de cinco compuestos que se identificaron como: una mezcla de los isómeros (+)-catequina y (-)-catequina, el compuesto fenólico 4-hidroxi-3-metoxifenil- β -D-glucopiranosido, el flavonoide quercitrina y el triterpeno β -sitosterol. Estos resultados y los reportados en la literatura para otras especies hemiparásitas, sugieren

que este tipo de plantas son una fuente de metabolitos secundarios diversos que resultan interesantes para realizar investigación fitoquímica y farmacológica con este tipo de especies.

Referencias Bibliográficas

- Al-Jaber HI, Mosleh IM, Mallouh A, Abu Salim OM, Abu Zarga MH. 2010. Chemical constituents of *Osyris alba* and their antiparasitic activities. *J Asian Nat Prod Res* 12(9): 814-20.
- Anmol, Aggarwal G, Sharma M, Singh R, Shivani, Sharma U. 2024. Ethnopharmacologically important highly subsidized Indian medicinal plants: Systematic review on their traditional uses, phytochemistry, pharmacology, quality control, conservation status and future prospective. *J Ethnopharmacol* 320: 117385.
- Bisht SS, Kumar R. 2021. Phytochemicals from indian sandalwood (*Santalum album* L.) and their adulterants: an overview. *Trop. Plant Res* 8(1): 6-12.
- Caraballo-Ortiz MA, Morales-Pérez AL. 2018. A lost Caribbean mistletoe rediscovered: new record for *Antidaphne wrightii* (Santalaceae) in Puerto Rico. *J Bot Res Inst Texas* 12(2): 683-687.
- Casale I. 1990. Anatomía de las hojas de las Loranthaceae venezolanas. I. *Antidaphne*. *Acta Bot Venez* 16(1): 13-25.
- Choudhary S, Chaudhary G. 2021. Sandalwood (*Santalum album*): ancient tree with significant medicinal benefits. *Int J Res Ayurveda Pharma Res* 9(4): 90-99.
- Christenhusz MJM, Byng JW. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3): 201-217.
- Cuong DTD, Dat HT, Duan NT, Thuong PD, Phat NT, Tri MD, Van Son D, Hoa NT, Tuyen PNK, Phung NKP. 2019. Isolation and characterization of six flavonoids from the leaves of *Sterculia foetida* Linn. *Vietnam J Chem* 57(4): 438-442.
- Der JP, Nickrent DL. 2008. A molecular phylogeny of Santalaceae (Santalales). *Syst Bot* 33(1): 107-116
- GBIF Secretariat. 2023. Global Biodiversity Information Facility Backbone Taxonomy. Checklist dataset. <https://doi.org/10.15468/39omej> [14/06/2024].
- González F, Suaza-Gaviria V, Pabón-Mora N. 2021. Floral development and morphology of the

- mistletoe *Antidaphne viscoidea*: a case of extreme flower reduction in the sandalwood family (Santalaceae). *Aust J Bot* 69: 152-161.
- Jung MJ, Heo SI, Wang MH. 2008. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chem* 108(2): 482-487.
- Kamal N, Clements C, Gray A, Edrada-Ebel R. 2016. Anti-infective activities of secondary metabolites from *Vitex pinnata*. *J Appl Pharm Sci* 6(1): 102-106.
- Kemal T, Feyisa K, Bisrat D, Asres K. 2022. *In vivo* antimalarial activity of the leaf extract of *Osyris quadripartita* Salzm. ex Decne and its major compound (-) catechin. *J Trop Med* 2022: 3391216.
- Killeen TJ, García EE, Beck SG. 1993. Guía de árboles de Bolivia. Herbario Nacional de Bolivia and Missouri Botanical Garden: La Paz, Bolivia. p. 719.
- Kuijt J. 1965. On the nature and action of the Santalalean haustorium as exemplified by *Phthirusa* and *Antidaphne* (Loranthaceae). *Acta Bot Neerl* 14:278-307.
- Kuijt J. 1968. Mutual affinities of Santalalean families. *Brittonia* 20: 136-147.
- Kuijt J. 1988. Monograph of the Eremolepidaceae. *Syst Bot Monogr* 18: 1-60.
- Kuijt J. 1998. *Antidaphne hondurensis* Kuijt, a second mesoamerican species of Eremolepidaceae. *Novon* 8(4): 402-404.
- Kumar R, Anjum N, Tripathi Y. 2015. Phytochemistry and pharmacology of *Santalum album* L.: a review. *World J Pharm Res* 4(10):1842-1876.
- Kumar S, Chhatwal RJ, Prasad A, Mehta S. 2023. Isolated phytochemicals and biological activities of *Dendrophthoe falcata*: a review. *Asian J Chem* 35(4): 805-814.
- Li G-H, Fang K-L, Yang K, Cheng X-P, Wang X-N, Shen T, Lou H-X. 2021. *Thesium chinense* Turcz.: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol* 273: 113950.
- Lin S, Liu M, Wang S, Li S, Yang Y, Shi J. 2010. Phenolic and Phenylethanoid glycoside from branch of *Fraxinus Sieboldiana*. *China J Chin Mat Med* 35(8): 992-996.
- Liu Z-Z, Ma J-C, Deng P, Ren F-C, Li N. 2023. Chemical constituents of *Thesium chinense* Turcz and their in vitro antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities. *Molecules* 28(6): 2685.
- Lombard N, van Wyk B-E, le Roux MM. 2020. A review of the ethnobotany, contemporary uses, chemistry and pharmacology of the genus *Thesium* (Santalaceae). *J Ethnopharmacol* 256: 112745.
- Machado ECS. Estudo químico das espécies *Eubrachion ambiguum*, Hook. & Arn. Engl., Loranthaceae e *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas, Moraceae. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas y Matemáticas, Brasil, 1995.
- Martin TS, Kikuzaki H, Hisamoto M, Nakatani N. 2000. Constituents of *Amomum tsao-ko* and their radical scavenging and antioxidant activities. *J Am Oil Chem Soc* 77(6): 667-673.
- Mejía PAL, Pombo OLM, Hernández MJF, Iregui PML, Ronderos OJ. 2019. Caracterización etnobotánica de las plantas medicinales empleadas en el tratamiento de las enfermedades cardiometabólicas, Villa de Leyva-Boyacá. *Rev Cubana Plant Med* 24(2): 1-22.
- Morales, JF. 2015. Santalaceae. In: Manual de Plantas de Costa Rica. Vol. VIII. EDs: Hammel BE, Grayum MH, Herrera C, Zamora N. (eds.). *Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard* 131: 13-36.
- Nickrent DL, Duff RJ. Molecular studies of parasitic plants using ribosomal RNA. In: *Advances in Parasitic Plant Research*. Eds Moreno MT, Cubero JI, Berner D, Joel D, Musselman LJ, C. Parker, Junta de Andalucía, Dirección General de Investigación Agraria, Córdoba, España, 1996, pp. 28-52.
- Nickrent DL, Malécot V, Vidal-Russell R, Der JP. 2010. A revised classification of Santalales. *Taxon* 59: 538-558.
- Niño J, Correa YM, Cardona GD, Mosquera OM. 2011. Antioxidant and antitopoisomerase activities in plant extracts of some Colombian flora from La Marcada Natural Regional Park. *Rev Biol Trop* 59(3):1089-1097.
- Orhan IE, Akkol EK, Suntar I, Yesilada E. 2019. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of the extracts and (+)-catechin obtained from *Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb (dwarf mistletoe). *S Afr J Bot* 120: 309-312.
- POWO. 2024. Plants of the World Online. Royal Botanic Gardens, Kew. <https://powo.science.kew.org/> [14/06/2024].
- Pullaiah T, Ramulu DR, Murthy KSR, Reddy VD, Saradamma B, Swamy MK. Phytochemistry and pharmacological properties of *Santalum album* L. In *The Sandalwood: silviculture, conservation, and applications*. Eds: Pullaiah T, Das SC, Bapat VA, Swamy MK, Reddy VD, Murthy KSR. Springer: Singapore, 2021. pp. 67-96.

- Rizzini CT. 1982. Loranthaceae. En: Flora de Venezuela. Eds: Luces de Febres Z, Steyermark J.A.). Ediciones Fundación Educación Ambiental, Caracas. 4(2): 7-316.
- Sharifi-Rad J, Quispe C, Turgumbayeva A, Mertdinç Z, Tütüncü S, Aydar EF, Özçelik B, Anna SW, Mariola S, Koziróg A, Otlewska A, Antolak H, Sen S, Acharya K, Lapava N, Emamzadeh-Yazdi S, Martorell M, Kumar M, Varoni EM, Iriti M, Calina D. 2022. *Santalum genus*: phytochemical constituents, biological activities and health promoting effects. *Z Naturforsch C J Biosci* 78(1-2): 9-25.
- Shwe HH, Thein WW, Win SS, Pe NN, Win T. 2019. Structural characterization of stigmaterol and β -Sitosterol from the roots of *Premna herbacea* Roxb. *IEESEM* 7(8): 195-201.
- Suárez AI, Chávez K, Blanco Z, Compagnone R, Tillet S, Torrico F. 2013. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Rev Lat Quím* 3: 163-170.
- Torres EB, Barrera AC. 1997. Hemiparásitas en la franja subandina del Departamento de Cundinamarca, Colombia. *Caldasia* 19(1/2): 257-267.
- Varela BG, Fernández T, Taira C, Zolezzi P, Ricco RA, López EC, Álvarez E, Gurni AA, Hajos S, Wagner ML. 2001. El "Muérdago Criollo", *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. -Loranthaceae- desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos. *Dominguezia* 17(1): 31-50.
- Vera A, Martínez M, Parra Y, Maldonado R, Carvajal N. 2014. Plantas hemiparásitas y hospederas presentes en el bosque xerófilo de la Ciénaga de La Palmita, estado Zulia, Venezuela. *Rev Fac Agron (LUZ) Supl. 1*: 213-223.
- Wagner ML, Ricco RA, Ranea FG, Gurni AA. 2009. Flavonoides de especies argentinas del género *Tripodanthus* (Eichl.) Tiegh. (Loranthaceae). *Dominguezia* 25(1):21-27.
- Wei J, Zhang C, Ma W, Ma J, Liu Z, Ren F, Li N. 2023. Antibacterial activity of *Thesium chinense* Turcz extract against bacteria associated with upper respiratory tract infections. *Infect Drug Resist* 16: 5091-5105.
- Zhang S, Liu X, Zhang ZL, He L, Wang Z, Wang GS. 2002. Isolation and Identification of the Phenolic Compounds from the Roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their antioxidant activities. *Molecules* 17(12):13917-13922.



Efecto de la *Ruellia tuberosa* L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa en células de epitelio renal en cultivo

Effect of *Ruellia tuberosa* L. on cell proliferation and cytotoxicity induced by high glucose concentration on renal epithelial cells in culture

CARLOS CIANGHEROTTI,^{1†}, GIOVANNINA ORSINI², ANITA ISRAEL³

Resumen

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que se caracteriza por hiperglicemia crónica, debido a un defecto en la secreción de la insulina, a un defecto en la acción de la misma, o a ambas. La hiperglicemia crónica se asocia con daño, disfunción e insuficiencia renal. La *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) es una planta de uso etnomédico, cuyas partes aéreas presentan actividad antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y analgésica. Con el fin de conocer su posible capacidad protectora ante las complicaciones renales de la diabetes, se evaluó el efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa en células de epitelio renal (Vero) en cultivo. Para ello, se estudiaron las modificaciones en la proliferación y muerte de las células de epitelio renal en cultivo. La RT protegió a las células Vero de la glucotoxicidad inducida por la alta glucosa, ya que el tratamiento por 96 horas de las células Vero con un medio que contenía una alta concentración de glucosa (grupo HG, 35 mM), produjo un efecto citotóxico significativo ($p < 0,001$) el cual fue parcialmente abolido por el tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de RT. Asimismo, se evaluó la proliferación de las células Vero mediante un método de exclusión por azul de tripano. En este modelo la condición de alta concentración de glucosa disminuyó la proliferación celular a partir de las 72 horas, efecto que fue parcialmente revertido por el tratamiento con RT, mejorando de esta manera la tasa de crecimiento. Todos estos hallazgos demuestran que la RT ejerce un efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vitro*, lo que aporta información acerca de los efectos farmacológicos de la especie.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., proliferación celular, citotoxicidad, células Vero

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia due to a defect in insulin secretion, insulin action, or both. Chronic hyperglycemia is associated with kidney damage, dysfunction, and failure. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) is an ethnomedical plant with aerial parts with antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activity. To assess its possible protective capacity against kidney complications induced by diabetes, the effect of the aqueous extract of the root of *Ruellia tuberosa* L. on cell proliferation and cytotoxicity induced by high glucose concentration was evaluated in renal epithelium (Vero) cell culture. To this end, modifications in the proliferation and death of renal epithelial cells in culture were studied. RT protected Vero cells from glucotoxicity induced by high glucose since treatment for 96 hours of Vero cells with a medium containing a high concentration of glucose (HG group, 35 mM) produced a significant cytotoxic effect ($p < 0.001$), which was partially abolished by treatment with 50 $\mu\text{g/mL}$ of RT. Likewise, Vero cell proliferation was evaluated using a trypan blue exclusion method. In this model, the high glucose concentration condition decreased cell proliferation after 72 hours, an effect that was partially reversed by RT treatment, thus improving the growth rate. All these findings demonstrate that RT exerts a protective effect on kidney damage in diabetes *in vitro*, providing information about the species' pharmacological effects.

Keywords: *Ruellia tuberosa* L., cell proliferation, cytotoxicity

*Laboratorio de Neuropeptidos. **Herbario "Victor Manuel Ovalles, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela
Correspondencia: astern88@gmail.com

Orcid: ¹[0000-0003-3760-8645](https://orcid.org/0000-0003-3760-8645)
²[0000-0001-8932-9942](https://orcid.org/0000-0001-8932-9942)
³[0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.5](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.5)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 16/10/2024
Aprobación: 01/11/2024

Introducción

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por un desequilibrio del metabolismo de la glucosa debido a defectos en la secreción de insulina por las células beta del páncreas (diabetes tipo 1) o por la disminución de la actividad de ésta a nivel celular (diabetes tipo 2), la cual generalmente viene acompañada por un déficit en la secreción de insulina; de manera que se produce un aumento de la glucosa sanguínea (Jerez Fernández y col., 2022). La diabetes mellitus constituye uno de los mayores problemas para los sistemas de salud de los países de Latinoamérica. La *International Diabetes Federation* (IDF) calcula que 34 millones de adultos con diabetes tipo 2 residen en nuestra región, y pronostica un crecimiento del 62% en el número de casos esperados para el año 2045 (IDF, 2019). Esta enfermedad se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública, debido a su alta morbilidad y a su asociación con otros trastornos como la obesidad, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca e insuficiencia renal (Braunwald, 2019; Dunlay y col., 2019).

El riñón al igual que la mayoría de los órganos afectados por la diabetes, sufre daño celular mediado por diferentes moléculas y mecanismos. La alta concentración de glucosa tiene efectos citotóxicos complejos en las células epiteliales renales, principalmente a través de mecanismos como el estrés oxidativo, la inflamación, la disfunción mitocondrial y la apoptosis, que en conjunto pueden llevar al daño renal crónico y enfermedades como la nefropatía diabética (Navarro González y col., 2022). Los efectos citotóxicos de la alta glucosa sobre las células epiteliales renales ocurren debido a la exposición

prolongada a niveles elevados de glucosa que ocurren en la diabetes. En efecto, la alta glucosa aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden dañar proteínas, lípidos y el ADN, afectando la estructura y la función celular, la supervivencia y la capacidad de regeneración de las células epiteliales renales. El daño prolongado puede llevar a la muerte celular y deterioro del tejido renal (Jha y col., 2016). Por su parte, la hiperglicemia activa vías inflamatorias que aumentan la producción de citoquinas y moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), y la inflamación crónica promueve el daño celular y el reclutamiento de células inmunes, que pueden agravar el daño tisular y contribuir al desarrollo de fibrosis renal (Navarro-González y Mora-Fernández, 2008). Adicionalmente, los altos niveles de glucosa llevan a la glicación no enzimática de proteínas, formando productos finales de glicación avanzada (AGEs) que alteran la función normal de las proteínas (Forbes y col., 2003). Además, la alta glucosa puede inducir un mal plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER), generando estrés del ER que desencadena respuestas celulares que pueden llevar a la apoptosis. Ambos procesos contribuyen a la citotoxicidad en las células epiteliales renales (Back y Kaufman, 2012). El estrés oxidativo, inflamación, disfunción mitocondrial pueden activar vías que promueven la apoptosis de células epiteliales renales que afecta integridad del epitelio renal, comprometiendo la función de los túbulos renales y acelerando el daño renal (Jha y col., 2016). Finalmente, bajo la condición de hiperglicemia crónica, las células renales sufren cambios fenotípicos que traen como consecuencia la fibrosis y la pérdida de la función renal, conduciendo al

establecimiento de la nefropatía (Simonson, 2007). Estos procesos fenotípicos alteran la estructura y la función de las células mesenquimales, epiteliales y las células progenitoras, en donde se produce una reprogramación nuclear inducida por algunas citoquinas y factores de crecimiento, trayendo como consecuencia la formación de miofibroblastos (MFT) a partir de las células mesangiales, fibroblastos intersticiales y células progenitoras, así como también la formación de miofibroblastos intersticiales a partir de las células del epitelio tubular; llevando en el primer caso a la expansión del mesangio y a la glomeruloesclerosis y en el segundo caso, a la fibrosis tubulointersticial (Simonson, 2007). La hiperglicemia puede inducir la transición epitelio-mesénquima, en la que las células epiteliales adquieren características de células mesenquimales, aumentando la producción de matriz extracelular (MEC). La acumulación excesiva de MEC conduce a la fibrosis, resultando en una pérdida progresiva de la función renal.

El efecto de la alta glucosa sobre la proliferación celular en células de epitelio renal afecta el crecimiento y la división de estas células. En condiciones normales, las células del epitelio renal regulan su proliferación para mantener la función adecuada del riñón. Sin embargo, cuando hay niveles altos de glucosa, como en la diabetes, esto puede alterar el comportamiento celular. La hiperglicemia crónica puede llevar a un aumento en la proliferación de las células del epitelio renal debido a varios mecanismos como el estrés oxidativo, ya que la alta glucosa aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que puede dañar las células y alterar su ciclo de proliferación (Wu y col., 2023). Igualmente, la activación de vías de señalización como la vía de AKT/mTOR o

MAPK promueven la proliferación celular y la fibrosis. Por su parte la inflamación también promueve la proliferación anormal de células en el riñón y los cambios en la expresión de genes involucrados en la división celular, haciendo que las células proliferen más rápido de lo normal (Ryu y col., 2010). Esto es importante porque una proliferación descontrolada de las células epiteliales renales puede contribuir al daño renal crónico y a condiciones como la nefropatía diabética, donde hay un deterioro progresivo de la función renal. Samikkannu y col. (2006) mostraron que la exposición a 25 mM de glucosa (alta concentración) es capaz de aumentar la proliferación de células epiteliales del túbulo proximal de humano (hPTEC), hasta las primeras 24 horas, seguido de una inhibición de la proliferación (evaluada por la incorporación de [3H]-timidina). Adicionalmente, estos autores demostraron que la exposición a altas concentraciones de glucosa por 10 minutos produce el mismo esquema de proliferación, observándose que esta exposición aguda es suficiente para producir los efectos antiproliferativos e inducir la muerte celular en el epitelio tubular, sugiriendo que los episodios no prolongados de hiperglicemia pueden conducir a la disfunción tubular.

En la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividades antidiabéticas o capaces de proteger o contrarrestar el daño renal inducido por las altas concentraciones de glucosa, se han desarrollado estudios etnofarmacológicos de plantas con potencial uso en la diabetes y sus complicaciones, así como también el aislamiento, purificación y elucidación de la estructura de los compuestos responsables de la actividad de estas especies (Khan y col., 2012; Hung y col., 2012).

Una de las plantas con gran potencial antioxidante (Arirudran y col., 2011a,b) que se encuentra en Venezuela es la *Ruellia tuberosa* L. (RT), conocida como escopetera, escopetilla o yuquilla, la cual pertenece a la familia Acanthaceae (Figura 1). Al igual que en otras partes del mundo, en nuestro país esta especie es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes (Ciangherotti y col., 2007), así como también para el manejo de las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales (Giraldo y col., 2009). Se ha evaluado farmacológicamente el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L., logrando validar su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Asimismo, investigadores de Sri Lanka, lograron validar el uso popular de RT para el tratamiento de la gastritis, utilizando un modelo de ratas con gastritis inducida por etanol (Arambewela y col., 2003). Aún más, Ciangherotti y col. (2013) demostraron que la RT presenta actividad antioxidante y que fue capaz de disminuir y/o revertir la alteración de los marcadores del daño renal inducido por la hiperglicemia. Igualmente, RT contrarrestó la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) inducida por la glucosa *in vivo*, indicando

que la RT ejerce un efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia y del estrés oxidativo.

En vista de la evidencia, el presente trabajo evaluó el posible efecto del *Ruellia tuberosa* L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa sobre las células de epitelio renal (Vero) en cultivo sometidas a altas concentraciones de glucosa. Para ello fueron evaluadas las modificaciones la proliferación y muerte de las células de epitelio renal.

Materiales Y Métodos

MATERIAL BOTÁNICO

La planta fue recolectada en los jardines de la Facultad de Ingeniería, entre el edificio de Ingeniería Mecánica y entrada de Las Tres Gracias, de la Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela. Fue identificada por la Lic. Giovannina Orsini Herbario "Victor Manuel Ovalles" (MYF) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Unos ejemplares vouchers fueron depositados en el herbario bajo el código MYF 26390, Colectada por el Dr. Stephen Tillett.



Figura 1. *Ruellia tuberosa* L.; A. flor y hojas, B. hojas y frutos, C. raíz. (Arirudran y col., 2011a)

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

La raíz de la planta fue separada y secada en una estufa a 50°C durante siete (7) días. Luego fue cortada en pequeños trozos y sometida a decocción a 60°C durante una hora. El extracto acuoso preparado fue liofilizado y mantenido bajo protección de la humedad. Posteriormente fue disuelto en agua destilada o medio de cultivo para los diferentes ensayos.

LÍNEA Y CULTIVO CELULAR

Para los experimentos *in vitro* fueron empleadas las células Vero en cultivo. Esta línea celular es susceptible al daño oxidativo inducido por la exposición a alta concentración de glucosa (Kannan y Jain, 1994). Las células Vero, una línea celular de epitelio renal de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Las células se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO₂ a 37 °C en medio completo que contiene: DMEM, 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomina. Luego se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino-fosfato) y se lisaron con tripsina 0,025 M en EDTA dejando incubar a 37°C por 5 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 2200 rpm. El sedimento se trató con PBS para formar una suspensión de células, la cual se utilizó para realizar los ensayos correspondientes.

DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

Para evaluar los efectos del RT sobre la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa, se realizó el

protocolo descrito por Kannan y Jain (1994) en células Vero y se empleó el ensayo de supervivencia celular desarrollado por Mosman (1983), el cual consiste en la formación de púrpura de formazán a partir de una sal de tetrazolio, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), en donde esta sal es reducida por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Para esto, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO₂ a 37°C), bajo un ambiente de 8 mM de glucosa durante 24 horas. El medio se removió y se reemplazó por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles, 8 mM de glucosa; pozos alta glucosa, 35 mM de glucosa; pozos RT (concentraciones crecientes) y pozos alta glucosa + RT. Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO₂ a 37°C) durante 96 horas, reemplazando con medio nuevo sobre el mismo esquema cada 24 horas. Al término de este tiempo el medio fue nuevamente reemplazado, pero solo con medio completo. Se preparó una solución de MTT (2,5 mg/mL) y se añadió 100 µL de ésta a cada pozo de la placa. Las placas se incubaron por 3h (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa será disuelta con la incorporación de 100 µL de DMSO. La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color y luego se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro de placa (BioRad, modelo Berchmark). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad con respecto al control.

DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Se empleó el método de exclusión con azul de tripano, a través del conteo diario

de las células vivas por microscopía. El azul de tripano es incapaz de atravesar las membranas plasmáticas de las células viables. De esta manera, se cultivaron 10000 células por placa individual en condiciones de glucosa normal o alta glucosa y tratadas con el RT. Las células se tripsinizaron y se contaron por grupo a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Los resultados se expresaron como células/mL.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se presentaron como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm EEM$). Los datos se analizaron con el programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por comparaciones múltiples de Bonferroni o una prueba de Dunnett. Los resultados con valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

EFFECTO DEL RT SOBRE LA VIABILIDAD Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la validación del modelo y para establecer la concentración de RT a emplearse en los todos los experimentos *in vitro*, se evaluó el efecto del RT sobre la viabilidad de las células Vero en cultivo mediante la prueba del MTT.

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA RAÍZ DE RUELLIA TUBEROSA L. (RT, 50 μ g/mL) SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS VERO EN CULTIVO CON O SIN UN AMBIENTE DE ALTA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (NG Y HG, RESPECTIVAMENTE)

El tratamiento por 96 horas, de las células Vero con medio que contenía una

alta concentración de glucosa (grupo HG, 35 mM), produjo un efecto citotóxico significativo ($p < 0,001$) en comparación con el grupo NG (8 mM de glucosa). Este efecto fue parcialmente abolido por el tratamiento con 50 μ g/mL del RT (Figura 2), por lo que queda establecido que este extracto inhibe el efecto glucotóxico sobre las células renales *in vitro* en las condiciones

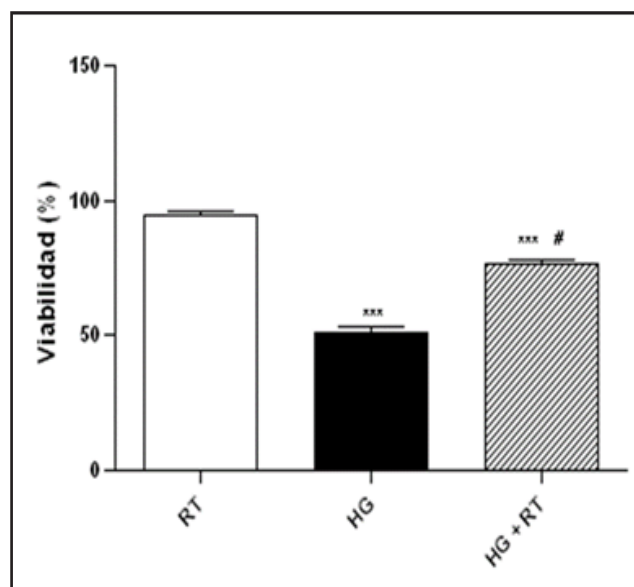


Figura 2. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) sobre la viabilidad de las células Vero en cultivo con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. # $p < 0,001$ con respecto al grupo HG. N=13-20

experimentales utilizadas.

La reducción de la muerte celular inducida por el RT (efecto protector) resultó ser un efecto dependiente de la concentración del extracto (Figura 3).

Asimismo, se evaluó la proliferación de las células Vero mediante un método de exclusión por azul de tripano. En este modelo la condición de alta concentración de glucosa trajo como consecuencia una disminución de la proliferación celular

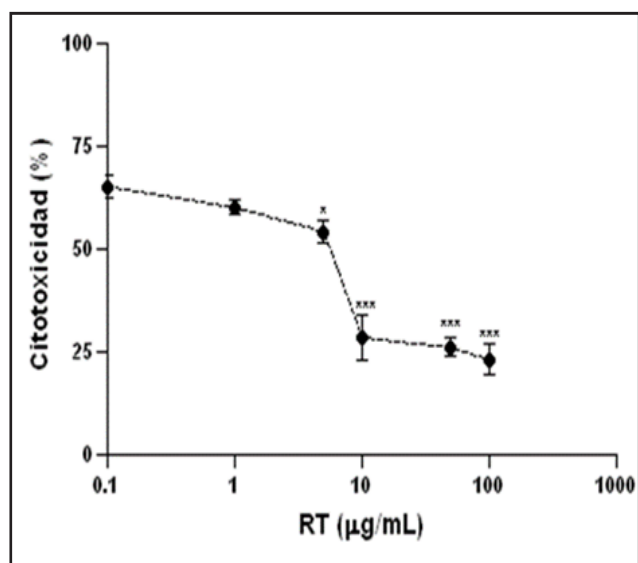


Figura 3. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa en células Vero. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p<0,005$ y *** $p<0,001$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo

a partir de las 72 horas, efecto que fue parcialmente revertido por el tratamiento con el RT, mejorando de esta manera la tasa de crecimiento. Por sí mismo, el RT produjo un efecto pro-proliferativo significativo ($p<0,01$) a las 96 y 120 horas de experimentación cuando se compara con el grupo NG, disminuyendo el tiempo de duplicación de 35,3 a 25,7 horas (Figura 4).

Discusión

Nuestros hallazgos demuestran que la *Ruellia tuberosa* L. ejercer un efecto protector sobre las células epiteliales renales sometidas a alta glucosa. Estos efectos podrían estar mediados por las propiedades antioxidantes de la RT, que se sabe que contiene compuestos polifenólicos, flavonoides y otros antioxidantes que pueden neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por la alta glucosa

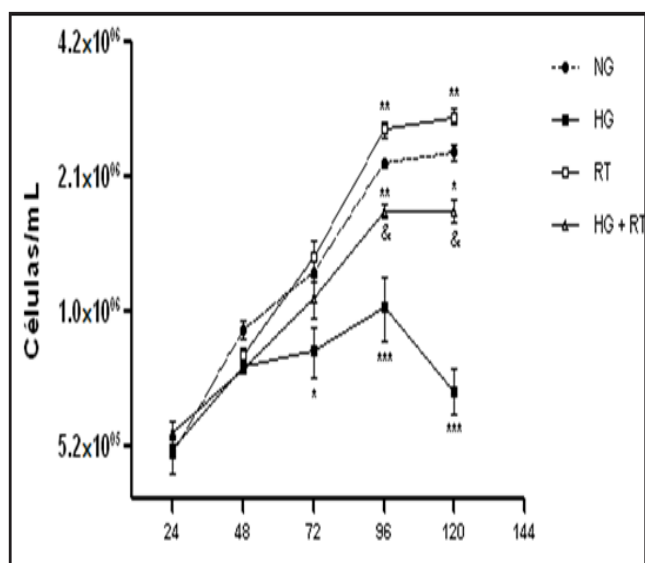


Figura 4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la proliferación de las células Vero-cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p<0,005$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ con respecto al grupo NG. & $p<0,005$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo

(Ciangherotti y col., 2016). En efecto, Ciangherotti y col. (2016) evaluaron el perfil fitoquímico preliminar y el contenido de polifenoles totales del extracto de RT, así como también sus efectos agudos sobre la glicemia en ratas diabéticas. Los resultados mostraron que el RT produjo un efecto hipoglicemiante tanto en los animales controles como en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, con porcentajes de variación de la glicemia comparables con el hipoglicemiante oral de referencia, la glibenclamida. La presencia de un alto contenido de polifenoles del extracto de raíz de RT, posiblemente se encuentre asociado con su actividad antidiabética y antioxidante, reflejada a través de la reacción del RT con el radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Así al reducir el estrés oxidativo evita el daño celular, protegiendo a las células epiteliales de la disfunción y la apoptosis.

Bajo un ambiente prolongado de alta concentración de glucosa las células tanto de epitelio tubular como las mesangiales sufren inhibición de la proliferación y apoptosis asociada a un incremento de la formación de las ROS (Allen y col., 2003; Samikkannu y col., 2006; Khera; 2006). Kannan y Jain (1994) demostraron que concentraciones de glucosa entre 20 y 100 mM causan una reducción de alrededor del 50% de la viabilidad celular en comparación con el control de 8 mM de glucosa. Ya que este efecto glucotóxico se acompaña de un aumento del estrés oxidativo, este modelo constituye una herramienta útil para el estudio de los efectos de la glucosa sobre las células renales. En este sentido, nuestros resultados apoyan estos hallazgos en cuanto a que el tratamiento con 35 mM de glucosa produjo una reducción de la viabilidad de las células Vero del $50,94 \pm 2,48 \%$, siendo este efecto inhibido significativamente por el RT de manera dependiente de la concentración. Estos resultados se confirman por los obtenidos en el ensayo de proliferación celular a través de un método de exclusión, en el cual se muestra, por un lado, un efecto pro-proliferativo del RT en condiciones basales y por otro un bloqueo parcial de la disminución del número de células inducida por el ambiente glucotóxico. Adicionalmente, Ciangherotti y col. (2022) demostraron que la RT protegió a las células Vero del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo, inducido por la alta glucosa, por el peróxido de hidrógeno y por el nitroprusiato de sodio, respectivamente; lo que apoya aún más que la RT, como antioxidante, ejerce su efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vitro*, a través de un mecanismo que involucra la disminución del estrés oxidativo y nitrosativo. Todos estos resultados sugieren

un efecto protector del extracto sobre daño renal inducido por la alta glucosa *in vitro*.

Con el fin comprender los mecanismos celulares y moleculares que puedan contribuir a la protección de RT frente a las complicaciones de la diabetes Ciangherotti y col. (2018) estudiaron la relación de la actividad protectora del extracto acuoso de la raíz de RT con su potencial inhibición de la vía de señalización de la proteína quinasa C/factor nuclear- κ B (PKC-NF- κ B) *in vitro*. Para ello, evaluaron la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en ambiente de alta glucosa (presente resultados) y en presencia de un estimulante de la PKC, el éster de forbol (PMA) en células Vero. Igualmente, estos autores estudiaron el efecto de RT sobre la actividad del NF- κ B inducida por el PMA en células HeLa. Los resultados mostraron que RT protegió a las células Vero de la glucotoxicidad, ya que, en condiciones de glucosa normal, el PMA disminuyó discretamente la viabilidad basal de RT; mientras que, en ambiente de alta glucosa, RT revirtió la glucotoxicidad en forma dependiente de la concentración. El PMA redujo por sí mismo la viabilidad celular y bloqueó completamente el efecto protector de RT a niveles citotóxicos similares al de HG solo. El PMA incrementó la expresión del NF- κ B en células HeLa y RT redujo significativamente este efecto. Estos hallazgos indican que el efecto protector que RT ejerce sobre el daño renal en la diabetes podría estar asociado al mecanismo que involucra la vía de señalización de la PKC-NF- κ B. Para comprender aun mas los mecanismos de señalización, Ciangherotti y col., (2021) estudiaron el efecto del tratamiento con el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) (10 mg/kg/día, p.o., durante cuatro semanas), sobre la

fosforilación de la quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK 1/2) en la corteza renal de ratas control y con diabetes tipo I inducida por la estreptozotocina. Igualmente evaluaron el papel de los marcadores de la fibrosis renal tales como el del peso del riñón, contenido de proteínas totales y de colágeno I. Estos autores demostraron que el tratamiento con RT previno el aumento de la fosforilación de las ERK 1/2, del peso del riñón, y del contenido de proteínas y de colágeno I renal en la diabetes inducida por ETZ, lo que sugiere un papel de las ERK 1/2 en el mecanismo de acción de la RT.

Los efectos de la RT *in vitro* están en concordancia con sus efectos *in vivo* como antidiabético y antioxidante. Así, Ciangherotti y col. (2013) al evaluar el efecto del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT) sobre el daño renal en un modelo de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) y su potencial actividad antioxidante, demostró que la RT presentó actividad antioxidante y fue capaz de disminuir y/o revertir la alteración de los marcadores del daño renal inducido por la hiperglicemia. Igualmente, RT contrarrestó la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales, CAT, la SOD, la GPx y la GR, inducida por la glucosa *in vivo*. Lo que establece que el RT actúa como un antioxidante ejerciendo un efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia y del estrés oxidativo.

Además de estas acciones de la RT, se han descrito sus efectos antiinflamatorios ya que se ha demostrado que la RT es capaz de reducir la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6 y otras moléculas relacionadas con la inflamación,

este efecto previene el daño a las células epiteliales y se reduce la probabilidad de fibrosis lo que contribuye a la preservación de la estructura y función del tejido renal (Roosdiana y col., 2020; Thi Pham y col., 2022).

En conclusión, nuestros resultados y la evidencia indica que la RT actúa como antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, tanto *in vivo* como *in vitro* a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, del estrés nitrosativo, y que involucra la vía de señalización de la PKC-NF-kB. La *Ruellia tuberosa* tiene potencial como agente protector contra el daño inducido por alta glucosa en células epiteliales renales gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que sugiere que podría ser útil en la prevención o tratamiento de complicaciones renales asociadas con la diabetes. Estos hallazgos aportan información acerca de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., y a la vez que contribuyen tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género.

Referencias Bibliográficas

- Allen D, Harwood S, Varagunam M, Raftery M, Yaqoob M. 2003. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases. *FASEB J* 17:908-910.
- Arambewela L, Thambugala S, Ratnasooriya W. 2003. Gastroprotective activity of *Ruellia tuberosa* root extract in rats. *Trop Med Plants* 4(2):191-199.
- Arirudran A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. 2011a. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using *in-vitro* model. *J Pharmacy Res* 4(12):4344-4347.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). *Pharmacognosy J* 3(22):29-34.

- Back SH, Kaufman RJ. 2012. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81:767-793.
- Braunwald E. 2019 Diabetes, heart failure, and renal dysfunction: The vicious circles. *Prog Cardiovasc Dis* 62:298-302.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Varela M, López-Gramcko JT, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2007. Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Acta Científica Venezolana* 58(Sup.1):252.
- Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G; Perdomo L, Álvarez M, Salazar Salazar-Bookaman M, Israel A. 2013. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 32(4):57-66.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicemiante aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas con diabetes experimental. *Revista Facultad de Farmacia* 79 (1 y 2):36-44.
- Ciangherotti C, Pimentel A, Benaim G, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2018. Papel de la vía de señalización proteína quinasa C - NF- κ B en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Revista Facultad de Farmacia* 81(1 y 2): 101-116.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Israel A. 2021. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la activación de las ERK 1/2 renal de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina. *Revista de la Facultad de Farmacia* 84(1 y 2): 41-54.
- Ciangherotti C, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Rodríguez M, Bermúdez J, Israel A. 2022. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en células Vero-sometidas a alta glucosa. *Revista de la Facultad de Farmacia* 85(1 y 2): 111-127.
- Dunlay SM, Givertz MM, Aguilar D, Allen LA, Chan M, Desai AS, Deswal A, Dickson VV, Kosiborod MN, Lekavich CL, McCoy RG, Mentz RJ, Piña IL. 2019. Type 2 diabetes mellitus and heart failure. A scientific statement from the American Heart Association and the Heart Failure Society of America. *Circulation* 140:e294-324.
- Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. 2003. Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(90003); S254-S258.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez* 32(2):267-301.
- Hung HY, Qian K, Morris-Natschke SL, Hsu CS, Lee KH. 2012. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat Prod Rep* 29(5):580-606.
- International Diabetes Federation. Atlas de la Diabetes de la FID. Novena edición 2019. International Diabetes Federation. 2019. Disponible en: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-SPAN-BOOK.pdf
- Jerez Fernández CI, Medina Pereira YA, Ortiz Chang AS, González Olmedo SI, Candy Aguirre Gaete M, 2022. Fisiopatología y alteraciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2: revisión de literatura. *Nova* 20(38):65-103.
- Jha JC, Banal C, Chow BS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. 2016. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 25(12):657-684.
- Kannan K, Jain SK. 1994. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res* 26(7):322-5.
- Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK A. 2012. Pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci* 4(1):27-42.
- Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO. 2006. Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest* 86(6):566-77.
- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Navarro González J, Mora Fernández C, Martínez Castela A, Gorrioz Teruel JL, Soler Romeo MJ, Fernando de Álvaro Moreno. 2022. Enfermedad renal diabética: etiopatogenia y Fisiopatología. *Nefrología al día*. Disponible: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-enfermedad-renal-diabetica-etiotopogenia-y-fisiopatologia-264-pdf>
- Navarro-González JF, Mora-Fernández C. 2008. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19: 433-442.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de

- Ruellia tuberosa* L. Revista de la Facultad de Farmacia UCV 75(2):1-16.
- Roosdiana A, Permata FS, Fitriani Riera I, Umam K, Safitri A. 2020. *Ruellia tuberosa* L. Extract Improves Histopathology and Lowers Malondialdehyde Levels and TNF Alpha Expression in the Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Veterinary Medicine International 8812758:1-7.
- Ryu JM, Lee MY, Yun SP, Han H.J. 2010. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF- β 1 expression via Ca²⁺/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways. Journal of Cellular Physiology 224;29-70.
- Samikkannu T, Thomas J, Bhat G, Wittman V, Thekkumkara T. 2006. Acute effect of high glucose on long-term cell growth: a role for transient glucose increases in proximal tubule cell injury. Am J Physiol Renal Physiol 291:F162-F175.
- Simonson M. 2007. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic Nephropathy. Kidney Int 71:846-854.
- Thi Pham, Trinh Nhat, Nguyen, Tuan Trong, Le Thi Nguyen, Thuy, Nguyen Tran, An Minh, Nguyen, Tuan Ngoc, Tong, Danh Thanh, Tien Le Dung. 2022. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Phytochemicals from *Ruellia tuberosa*. Journal of Chemistry 4644641:1-14.
- Wu T, Ding L, Andoh V, Zhang J, Chen L. 2023. The Mechanism of Hyperglycemia-Induced Renal Cell Injury in Diabetic Nephropathy Disease: An Update. Life 13: 539.



Bioavailability and molecular recognition between secondary metabolites of *Euphorbia hirta* L. and 5-lipoxygenase using fragment molecular orbital method and pair interaction energy decomposition analysis

Biodisponibilidad y reconocimiento molecular entre metabolitos secundarios de *Euphorbia hirta* L. y 5-lipoxigenasa usando el método de orbitales moleculares de fragmentos y análisis de descomposición energética de interacción de pares

EMILDO MARCANO^{*1}, YSBELIA SÁNCHEZ^{**2}

Abstract

Is presented the bioavailability analysis for seven secondary metabolites from *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae). The bioactivity score, the molecular similarity analysis for each secondary metabolite, and the molecular docking 5-LOX/metabolite complex are also presented. For the similarity analysis, it is referenced the structure of allosteric LOX-5 inhibitor 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA). The fragment molecular orbital method (FMO) and pair interaction energy decomposition analysis (PIEDA) were applied to evaluate the interaction energy between secondary metabolites and the 5-LOX active site. Log P values of all the secondary metabolites studied were found to be higher than 5, contrary to what was expected with Lipinski's rules of five. The reference LOX-5 ligand has a high electrostatic potential similarity with most secondary metabolites studied, with values from 0.667 to 0.730. Both, AKBA and metabolites ligands were wedged between the two domains of LOX-5, and the main residues contact were LEU-66, ARG-68, VAL-110, HIS-130, ILE-126, GLN, 129 and LYS-133. The PIEDA analysis showed that stabilization in the 5-LOX active site is mainly dominated by hydrophobic interactions, with values up to -35 Kcal/mol. Due to the low presence of terminal-OH groups, electrostatic origin and charge transfer interaction energies are also important but have values of less than 20 Kcal/mol.

Keywords: *Euphorbia hirta* L., LOX-5 inhibitor, PIEDA analysis, FMO, bioactivity score, molecular similarity analysis, molecular docking

Resumen

Se reporta el análisis de biodisponibilidad de siete metabolitos secundarios de *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae). Además, se presenta la puntuación de bioactividad, el análisis de similitud molecular para cada metabolito secundario y el acoplamiento molecular del complejo 5-LOX/metabolito. Para el análisis de similitud, se utilizó como referencia la estructura del inhibidor alostérico de LOX-5, el ácido 3-acetil-11-ceto-beta-boswélico (AKBA). Se aplicó el método de orbitales moleculares de fragmentos (FMO) y el análisis de descomposición de energía de interacción de pares (PIEDA) para evaluar la energía de interacción entre los metabolitos secundarios y el sitio activo 5-LOX. Se encontró que los valores de Log P de todos los metabolitos secundarios estudiados eran superiores a 5, contrariamente a lo esperado con las reglas de cinco de Lipinski. El ligando LOX-5 de referencia tiene una alta similitud de potencial electrostático con la mayoría de los metabolitos secundarios estudiados, con valores de 0,667 a 0,730. Tanto los ligandos de AKBA como los de sus metabolitos estaban encajados entre los dos dominios de LOX-5, y los principales residuos en contacto fueron LEU-66, ARG-68, VAL-110, HIS-130, ILE-126, GLN, 129 y LYS-133. El análisis PIEDA mostró que la estabilización en el sitio activo de 5-LOX está dominado principalmente por interacciones hidrofóbicas, con valores de hasta -35 Kcal/mol. Las energías de interacción de origen electrostático y de transferencia de carga también son importantes, pero tienen valores inferiores a 20 Kcal/mol, debido a la baja presencia de grupos -OH terminales.

Palabras clave: *Euphorbia hirta* L., Inhibidor de LOX-5, análisis PIEDA, FMO, índice de bioactividad, análisis de similitud molecular, acoplamiento molecular

* Departamento de Química. Laboratorio de Computación de Alto Rendimiento **Laboratorio de Investigaciones Genéticas. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), Venezuela. Correspondencia: jedi148@gmail.com

Introduction

Leukotrienes (LT) are lipid mediators that are pivotal in acute and chronic inflammation and allergic diseases linked to asthma and atherosclerosis. LT biosynthesis is initiated by 5-lipoxygenase (5-LOX) with the assistance of the substrate-binding 5-LOX-activating protein at the nuclear membrane (Rådmark and Samuelsson, 2009). LOX enzymes from mammals consist of two domains. An N-terminal regulatory C2-like domain (residues 1–112 in 5-LOX) mainly consists of β -sheets, and a C-terminal catalytic domain (residues 126–673 in 5-LOX) is mainly helical in structure and contains iron (Rådmark et al., 2015). The products of 5-lipoxygenase are synthesized and released in the airway when an asthmatic reaction occurs. 5-lipoxygenase, via arachidonic acid metabolism, produces leukotrienes that mediate bronchoconstriction and inflammatory modifications essential in the pathophysiology of asthma. In the past, arachidonate 5-lipoxygenase inhibitors have been investigated to attenuate the activity of 5-LOX. Many of these inhibitors are based on natural product extracts. For example, pharmacological testing revealed human 5-lipoxygenase as a molecular target of the predatory myxobacterium *Pyxidicoccus fallax* HKI 727 myxochelins extracts. In particular, myxochelin A efficiently inhibited 5-LOX activity with an IC₅₀ of 1.9 μ M (Schieferdecker et al., 2015). In the case of plants, extracts from many species have also been investigated for inflammatory response and 5-LOX inhibition (Lončarić et al., 2021; Gadnayak et al., 2022; Liu et al., 2023), highlighting pentacyclic triterpenes as a rich natural resource of promising compounds for drug development. Therefore, the inhibitory activities of 29 natural oleanane and ursane

pentacyclic triterpenes were evaluated against the 5-LOX activity, and the analysis of the structure-activity relationships revealed that the presence of a hydroxy was beneficial in terms of the inhibition (Quynh Vo et al., 2019). Lipoxygenase inhibition and molecular docking studies of secondary metabolites from the leaves of *Alstonia scholaris* has been reported. Molecular docking results identified the main interaction sites HIS 518 and GLN 514 (Ghansenyuy et al., 2023).

Specifically, and for our interest, ethanol *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) leaf extract exhibited significant anti-inflammatory activity than root by inhibiting albumin denaturation, proteinase, and the lipoxygenase activities with 87.51 %, and 51.2 % followed by 97.30 %, and 54.21 % followed by 94.43 % and 48.21 %, respectively, at 100 μ g/mL (Das et al., 2022). *Euphorbia hirta* L. is one of the common plants in the subtropical region and is considered a weed distributed to the hotter parts of tropical and sub-tropical countries. *Euphorbia hirta* L. is an erect or decumbent herb 40 to 60 cm long, with simple, opposite leaves with red spots. The inflorescence on the fruit is capsule-shaped and has white latex. In the last years, the secondary metabolites from the genus *Euphorbia* have been highlighted as potential compounds for drug design with different molecular targets (Shi et al., 2008), and antimicrobial, anti-inflammatory, anti-amoebic, antifertility, anti-malarial, antioxidant, sedative, cytotoxic, aflatoxin inhibition, larvicidal, immunomodulatory, and other properties were reported (Verma, 2017).

Most studies on the anti-inflammatory properties of *Euphorbia* secondary metabolites are based on *in vivo* results.

Thus, to contribute to the molecular perspective of these compounds, we report the bioavailability analysis for seven secondary metabolites from *Euphorbia hirta* L. previously reported (Shi et al., 2008). The bioactivity score, the molecular similarity analysis for each secondary metabolite, and the molecular docking 5-LOX/metabolite complex are also presented. To solve the lack of computational resources for applying molecular dynamics simulations, we have applied the fragment molecular orbital method (FMO) and pair interaction energy decomposition analysis (PIEDA) to evaluate the interaction energy between secondary metabolites and the 5-LOX active site.

Computational details

2.1 GEOMETRIC OPTIMIZATION AND MOLECULAR SIMILARITY ANALYSIS

The molecular similarity principle states that molecules with similar structures tend to have similar properties (Bender and Glen, 2004). Indeed, the observation that common sub-structural fragments lead to similar biological activities can be quantified from database analysis (Eckert and Bajorath, 2007). The secondary metabolites studied are shown in Figure 1. These compounds are triterpenes extracted from *Euphorbia hirta* L., whose cytotoxic and antimicrobial potentials have been documented (Ragasa and Cornelio, 2013).

For the similarity analysis, we used as a reference the structure of allosteric LOX-5 inhibitor 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) (Gilbert et al., 2020). For all structures, the geometric optimizations were carried out at the DFT CAM-B3LYP/6-31(d) level using the GAMESS software

package (Schmidt et al., 1993) on the ChemCompute website (Perri and Weber, 2014). The molecular similarity calculations were carried out with the ShaEP software package. ShaEP performs rigid-body superimposition of 3D molecular models using a matching algorithm (Vainio et al., 2009). Two characteristic scores were calculated for comparison: 3D shape and electrostatic potential (ESP) (Shin et al., 2015). These scores range from 0 to 1, in which 0 and 1 correspond to no similarity and the same molecules. As a complement to the ShaEP results, the ESP mapped was obtained at the DFT CAM-B3LYP/6-31(d) level.

2.2 BIOAVAILABILITY PREDICTION

Properties of molecules such as bioavailability or membrane permeability have often been connected to simple molecular descriptors such as logP (partition coefficient), molecular weight (MW), or counts of hydrogen bond acceptors and donors in molecule (Muegge, 2003). These descriptors are included in the Lipinski "Rule of Five" (Lipinski et al., 1997). The rule states that most molecules with good membrane permeability have $\log P \leq 5$, molecular weight ≤ 500 , hydrogen bond acceptors ≤ 10 , and hydrogen bond donors ≤ 5 . To evaluate the bioavailability of the secondary metabolites studied, the Lipinski's parameters were calculated using Molinspiration Cheminformatics software (Molinspiration, 1986).

2.3 PREPARATION OF LOX-5 PROTEIN AND MOLECULAR DOCKING

The allosteric inhibitor 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) from

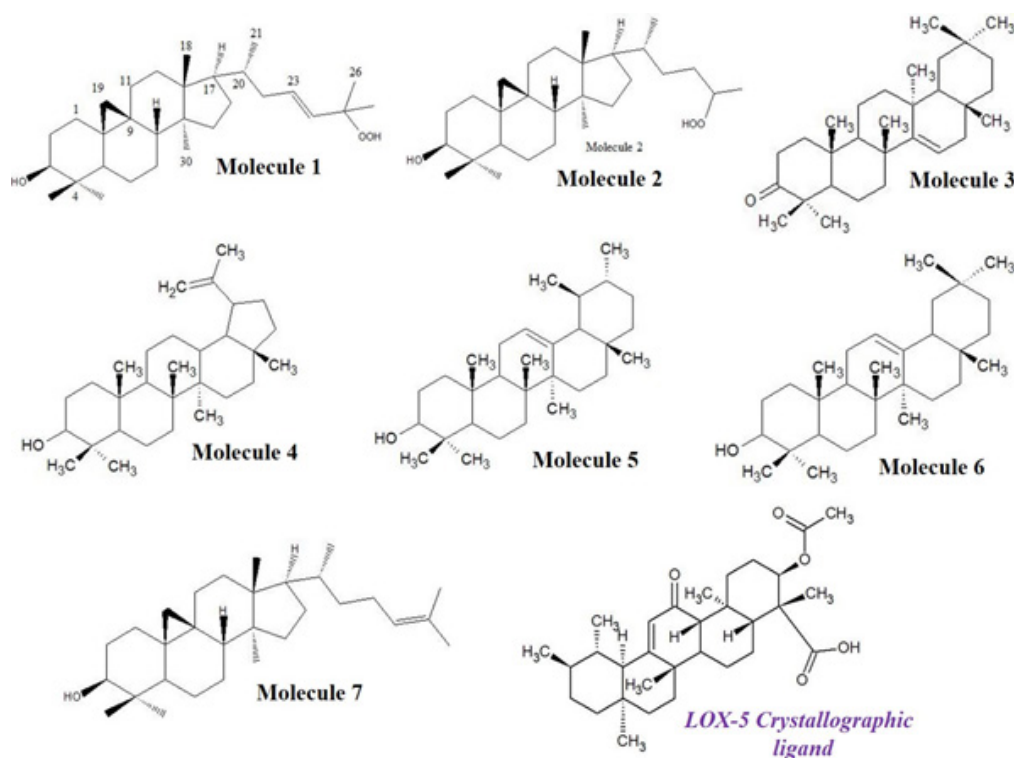


Figure 1. Triterpenes secondary metabolites studied and AKBA LOX-5 ligand reference

frankincense wedges between the membrane-binding and catalytic domains of LOX-5, some 30 Å from the catalytic iron (PDB ID: 6NCF) (Gilbert et al., 2020). It was used to study the interaction with the triterpene's secondary metabolites from *Euphorbia hirta* L. We retained a LOX-5 AKBA complex consisting of 676 residues from the tetrameric PDB structure, from SER-15 to ILE-673. Hydrogen atoms were added to the model using the VEGA ZZ package (Pedretti et al., 2004). Atomic charges were assigned using the Gasteiger-Marsili method (Gasteiger and Marsili, 1980). AKBA ligand, catalytic iron, water, and other crystal molecules were removed. Secondary metabolites from *Euphorbia hirta* L. were optimized using CAM-B3LYP/6-31(d) DFT level. Later, the ligands were prepared for docking experiments defining rotatable bonds using AutoDock Tools version 1.5.6. A grid box size of 40, 40, and 40 Å was generated and allocated at the center of

the receptor/binding site using x, y, and z coordinates of 0.285, 0.047, and -0.004, respectively. Molecular docking simulations of all structures were performed using AutoDockVina software (Trott and Olson, 2010) VEGA ZZ was used to visualize all structures. A co-crystallized AKBA ligand was docked to validate the docking protocol. Finally, the major interaction mode (from energy affinity) was analyzed for each structure studied with the fragment molecular orbital method (FMO).

2.4. FRAGMENT MOLECULAR ORBITAL METHOD (FMO)

The FMO method is a general quantum chemical method and is one of the most efficient approaches for studying biomolecules. In the FMO method, a protein can be divided into smaller pieces called fragments or monomers; for example, each

residue can be represented as a fragment (Gonzalez and Mroginski, 2019). As a result of FMO calculations, we can obtain the interaction energy between interacting monomer pairs, which is advantageous because it allows the estimation of PIEs, describing the strength of the interaction between individual fragments (Fedorov and Kitaura, 2012). Then, Pair Interaction Energy Decomposition Analysis (PIEDA) can gain valuable insights into the chemical nature of noncovalent interactions between proteins and ligands. Noncovalent interactions such as salt bridges, hydrogen bonds, or polar interactions are dominated by the electrostatic and charge-transfer terms, while hydrophobic interactions are dominated by the dispersion term (Fedorov and Kitaura, 2006). For each triterpene studied (Figure 1), the major interaction mode for LOX-5/ligand complex was optimized at B3LYP/6-31(d) DFT level and then analyzed with the fragment molecular orbital method (FMO) at the same theory level, using GAMESS. The fragmentation, FMO input files and PIEDA values visualization analysis were carried out for all interaction modes using the Facio program interface tool (Suenaga, 2005). The Grimme's dispersion correction was added.

Results and Discussion

3.1 Bioavailability (Lipinski parameters)

Lipinski's rule is widely used to determine molecular properties important for a drug's pharmacokinetic *in vivo*. Table I contains the calculated molecular polar surface area (TPSA) and Lipinski's parameters of the

Euphorbia hirta L. secondary metabolites investigated.

Molecular hydrophobicity or lipophilicity is indicated by the octanol/water partition coefficient (Log P). Drug molecules' hydrophilic/lipophilic nature affects drug permeability across the cell membranes. Log P values of all the secondary metabolites studied were found to be higher than 5, contrary to what was expected with Lipinski's rules of five. However, the log P values obtained are comparable to those reported for triterpenoids interacting with 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type2 (Yamaguchi et al., 2011). According to theoretical and experimental reports, these compounds are described as lipophilic and high permeability structures (Wang et al., 2015; Bennion et al., 2017).

Total polar surface area (TPSA) is closely related to the hydrogen bonding potential of a molecule. It is a good predictor of drug transport properties such as intestinal absorption, bioavailability and blood-brain barrier penetration (Pajouhesh and Lenz, 2005). Molecules with a polar surface area greater than 140 \AA^2 tend to be poor at permeating cell membranes (Nielsen et al., 2017). For molecules to penetrate the blood-brain barrier, a PSA of less than 90 \AA^2 is usually needed (Hitchcock and Pennington, 2006). TPSA of molecules studied was found in the range of 20-81 \AA^2 , which agrees with the above mentioned limits (Table I). Therefore, all triterpenes of Figure 1 show a good capacity to penetrate the blood-brain barrier. Also, the TPSA values obtained agree with those reported for triterpenoids from *Vernonia patula* Merr. interacting with Cannabinoid Type 1 Receptor (Siraj et al., 2021). Several rotatable bonds are a simple topological parameter that measures molecular flexibility and is considered a

Table I.
Calculated molecular polar surface area (TPSA), and Lipinski parameters of the *Euphorbia hirta* L. secondary metabolites investigated

Molecule	Volume	TPSA	Nrot	n ON accept	n OHNH donors	Log P	MW
LOX-5 cristal							
ligand	493.94	80.67	3	5	1	6.15	498.7
1	477.97	49.69	5	3	2	7.05	458.73
2	478.85	49.69	6	3	2	7.17	458.73
3	454.84	17.07	0	1	0	7.84	424.71
4	461.6	20.23	1	1	1	8.29	426.73
5	461.05	20.23	0	1	1	8.08	426.73
6	460.7	20.23	0	0	1	8.02	426.73
7	461.26	20.23	4	4	1	8.21	426.73

good descriptor of the oral bioavailability of drugs. It has been shown that higher oral bioavailability is associated with lower rotatable bond count. Rotational bonds make the compounds flexible; hence, they easily interact with specific rigid binding areas (Veber et al., 2002). The 1, 2, and 7 structures studied show lower molecular flexibility due to the range of rotatable bonds (4-6) than the crystallographic ligand for LOX-5. On the other hand, molecules 3, 5, and 6 do not show rotatable bonds. Therefore, these molecules are expected to show less molecular flexibility and less interaction with specific rigid binding areas in LOX-5. The number of hydrogen bond acceptors (O and N atoms) and the number of hydrogen donors (NH and OH) in the tested compounds were within Lipinski's limit, i.e., less than 10 and 5, respectively.

3.2 BIOACTIVITY SCORE

The predicted bioactivity scores of studied compounds (G protein-coupled receptors (GPCRs) ligand, ion channel modulator, kinase inhibitor, nuclear receptor ligand,

protease inhibitor, and enzyme inhibitory activity), as well as their comparison with the crystallographic ligand for LOX-5 are summarized in Table II. As a general rule, the larger the bioactivity score, the higher the probability that the investigated compound will be active. Therefore, a molecule with a bioactivity score of more than 0.00 will likely possess considerable biological activities. At the same time, values from 0.50 to 0.00 are expected to be moderately active; if the score is less than -0.50, it is presumed inactive (Ochieng et al., 2017).

Table II shows that the triterpenes metabolites studied can act primarily as nuclear receptor ligands and other enzyme inhibitors. Additionally, these molecules also can act moderately as GPCR ligands. Nuclear receptors are transcription factors actively involved in many aspects of human physiology and pathology, serving as sensors of stimuli, master regulators of downstream molecular events, and hubs governing complex gene regulatory networks (Zhao et al., 2019). The identification of bioactive triterpenes as putative ligands in nuclear receptors has been reported in the past (Grienke et al.,

Table II.
Predicted bioactivity scores of the secondary metabolites investigated

Molecule	GPCR ligand	Ion channel modulator	Kinase inhibitor	Nuclear receptor ligand	Protease inhibitor	Enzyme inhibitor
LOX-5 cristal ligand	0.07	0.01	-0.68	0.67	0.16	0.56
1	0.34	0.09	-0.33	0.85	0.15	0.74
2	0.21	0.07	-0.4	0.84	0.1	0.74
3	0.07	-0.1	-0.4	0.43	-0.14	0.37
4	0.27	0.11	-0.42	0.85	0.15	0.52
5	0.22	-0.02	-0.41	0.79	0.19	0.6
6	0.22	-0.05	-0.31	0.67	0.11	0.56
7	0.21	0.1	-0.4	0.86	0.14	0.66

2011). In the case of the LOX-5 enzyme, the structure-activity relationships of pentacyclic triterpenoids as inhibitors have been reported, emphasizing the importance of the presence of hydroxyl and carboxylic acid groups in this interaction (Quynh Vo et al., 2019).

3.3 MOLECULAR SIMILARITY

The aim of this work is to explore the inhibitor potential of the secondary metabolites from *Euphorbia hirta* L. (Figure 1) against LOX-5, taking as reference the crystallographic ligand recently reported and available from the Protein Data Bank (Gilbert et al., 2020). Starting from the knowledge of this crystallographic ligand, we analyzed the molecular similarity between the triterpene metabolites of *Euphorbia hirta* L. Two important properties, 3D shape, and electrostatic potential (ESP) of secondary metabolites, were compared with the reference ligand, and the results are shown in Table III.

It is shown that the secondary metabolites studied have a good shape similarity with the reference ligand with values from 0.571 (molecule 1) to 0.695 (molecule 3). These molecules possess a similar framework of rings, substituted in some cases for –OH groups and unsaturated chains. The substitution of unsaturated chains in molecules 1, 2, and 7 is responsible for the decrease in the 3D shape values. It is also shown that the reference LOX-5 ligand has a high ESP similarity with most secondary metabolites studied, with values from 0.667 to 0.730. As a complement to the ESP results in Table III, Figure 2 shows the ESP mapped obtained at B3LYP/6-31(d) DFT level.

The high ESP similarity in these compounds and the reference ligand may be due to hydroperoxyl (-ROOH) and -OH functional groups close to the molecular ring framework. On these functional groups is spread the region of negative electrostatic potential, specifically on the lone pair oxygen atoms. Therefore, these oxygen atoms can be identified as reactive zones of

Table III.
3D-shape, electrostatic potential (ESP) and average for the secondary metabolites investigated

Molecule	Reference: LOX-5 crystallographic ligand		
	3D-Shape	ESP	Average
1	0.571	0.762	0.667
2	0.557	0.779	0.668
3	0.695	0.660	0.677
4	0.619	0.798	0.709
5	0.634	0.826	0.730
6	0.638	0.795	0.717
7	0.581	0.765	0.673

the molecules studied (Anzline et al., 2020). Thus, it is expected that when the molecules of Figure 1 come near the LOX-5 active site, these are attracted, and a charge transfer occurs between the different molecules involved. This process continues until the electrophilicity of the two molecules gets equal and after that there will be no

interaction or transfer of charges (Anzline et al., 2017). Finally, when the 3D shape and ESP values are averaged, we observed a high similarity of the metabolites studied with the LOX-5 reference ligand.

3.4 MOLECULAR DOCKING

As an observer in Table III, the molecular similarity of triterpenes studied suggests these molecules could also interact with the LOX-5 active site. Therefore, in the present study, molecular docking was performed to identify the docking score of seven structures of Figure 1 towards the active site of the allosteric inhibitor 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) recently reported (Gilbert et al., 2020). Figures 3a and 3b show the redocking results for the reference AKBA ligand previously optimized at CAM-B3LYP/6-31(d) DFT level.

As expected, the ligands were wedged between the two domains of LOX-5, and the main residues contact were LEU-66, ARG-

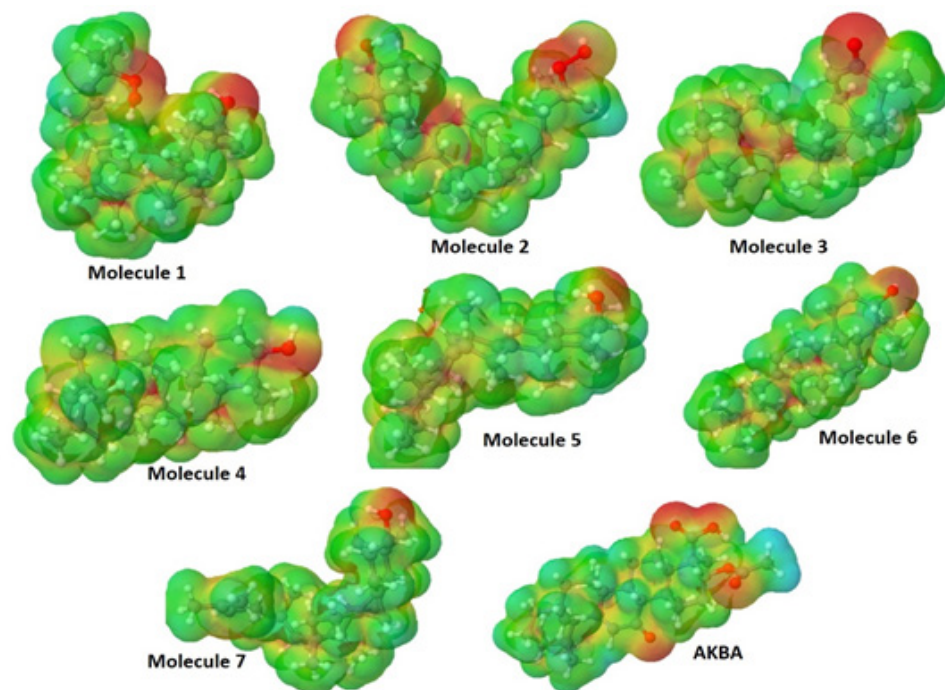


Figure 2. TESP mapping was obtained at the B3LYP/6-31(d) DFT level for the secondary metabolites investigated

Table IV.

Affinity Energy for AKBA and the triterpenes reported from *Euphorbia hirta* L.

Molecule	Affinity Energy (kcal/mol)
LOX-5 cristal ligand	-9,8
1	-7,2
2	-8,0
3	-8,6
4	-9,6
5	-8,4
6	-10,2
7	-7,8

68, VAL-110, HIS-130, ILE-126, GLN, 129 and LYS-133. The best mode of interaction for redocking showed an affinity energy of -9.8 kcal/mol calculated with AutoDock-Vina. For the series molecules in Figure 1, structure 6 showed a better stabilization affinity energy (-10.6 kcal/mol) (Figure 3c), highlighting interactions with the residues VAL-129, ARG-68, LEU-66, GLU-108, VAL-110, VAL-107, ILE-126, LYS-133, THR-137 and GLN-129. Structures 1 and 7 showed the lowest affinity energy, while the rest of the structures showed values comparable to those of the reference ligand (Table IV).

3.5 FMO CALCULATIONS

Figure 4 shows the Fragment molecular orbital method (FMO) analysis results of the triterpenes studied and their comparison with the crystallographic ligand reported for LOX-5. Each FMO analysis considered the residues of the best interaction mode according to molecular docking results. Additionally, Figure 5 shows the par interaction energies decomposition (PIEDA) in their electrostatic components, exchange, charge transfer, and dispersion. According

to the results, and in agreement with those reported by Gilbert et al. (2020), the AKBA ligand is mostly stabilized by interactions with residues LEU-66 (-8.453 kcal/mol), VAL-110 (-6.836 kcal/mol), and the HIS-130/GLN-129 (-16.871 kcal/mol). As seen in Figure 5, stabilization is mainly dominated by hydrophobic interactions (green bar). For amino acid residues such as VAL-110, electrostatic (blue bar) and charge transfer interactions (yellow bar) account for the hydrogen (N-O) bond between the residue and AKBA. In the case of the proposed molecules, some of the aforementioned interactions are preserved, and new ones appear as a result of the structural changes of each molecule.

For molecule 1, the best interaction is observed with the GLU-108/VAL-107 pair (-23.038 kcal/mol), which is dominated by dispersion interactions, while the energy

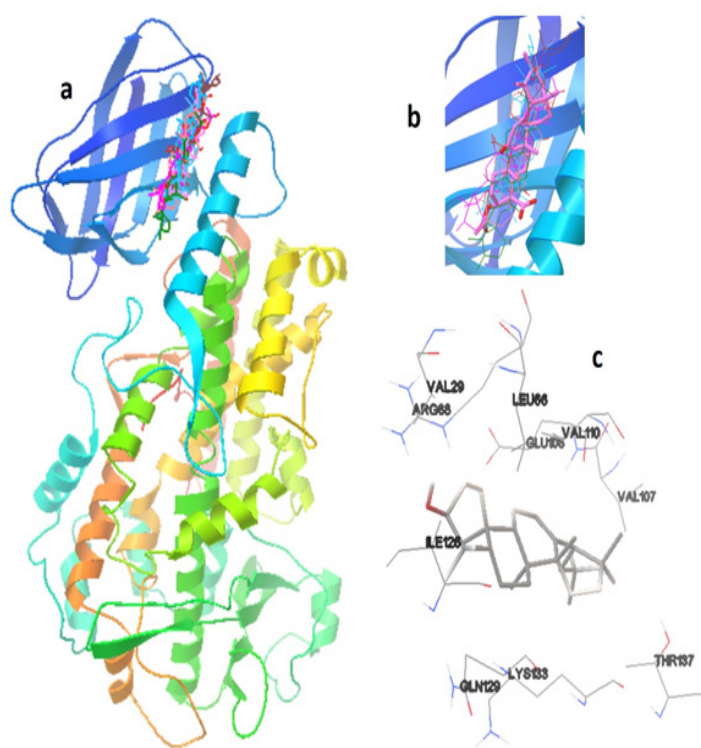


Figure 3. Redocking is used to reference the AKBA ligand (a, b) and the interaction mode for molecule 6 (c). All ligands were previously optimized at CAM-B3LYP/6-31(d) DFT level

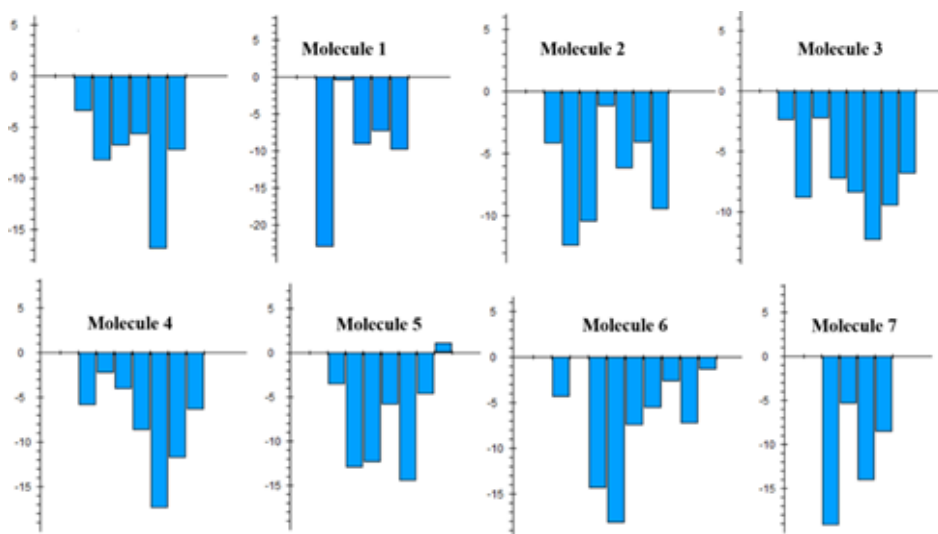


Figure 4. FMO analysis of the triterpenes studied and their comparison with the crystallographic ligand reported for LOX-5

interaction with VAL-110 significantly decreased. The decrease in the number of carboxylic groups in the ring system of structure 1 decreases the possibility of hydrogen bonding with VAL-110 and other residues. In fact, as shown in Figure S1 (supplementary material), the aliphatic chain and ring system are more exposed toward the GLU-108/VAL-107 residues, which justifies the stabilization by dispersion. In contrast, the -H atom in the terminal -OH group in the ring system is 3.38 Å from the N atom of VAL-110. For structure 1, interactions with THR-137 are also important (-7.38 kcal/mol), in agreement with Gilbert et al. (2020), and are dominated by dispersion interactions. According to our results (Figure 5 and Figure S1 in supplementary material), the contribution by charge transfer for the protein-molecule one complex, is justified by the coupling of the frontier orbitals (HOMO-molecule 1)/(LUMO-protein) between the aliphatic chain together with the terminal oxygen on the ligand (HOMO) and the amino acid fragment of GLU-134 (LUMO).

Molecule 2 shows significant agreement with the interacting fragments of LOX-5 with AKBA. In this case, ARG-68 (-12,433 kcal/mol) and ARG-101 (-10,523 kcal/mol) have the major stabilization energy. PIEDA results for ARG-101 show the highest stabilization by electrostatic and charge transfer contributions. Unlike molecule 1, and in accordance with AKBA, for molecule 2, VAL-110 shows the best contribution for the electrostatic terms (-13,698 kcal/mol), charge transfer (-34,492 kcal/mol), and dispersion (-18,455 kcal/mol). Figure S2 shows a hydrogen bridge between (VAL-110) -NH: OOH-*ligand* (1.82 Å). On the other hand, the charge transfer contribution due to coupling of the orbital boundaries (HOMO-*ligand*)/(LUMO-LOX5) occurs between the aliphatic chain together with the terminal oxygens of the ligand (HOMO) and the amino acid fragment of LYS-133 (Figure S2).

Molecule 3 removes the aliphatic chain and terminal oxygen atoms from the -RHO group, and the ring system is like AKBA.

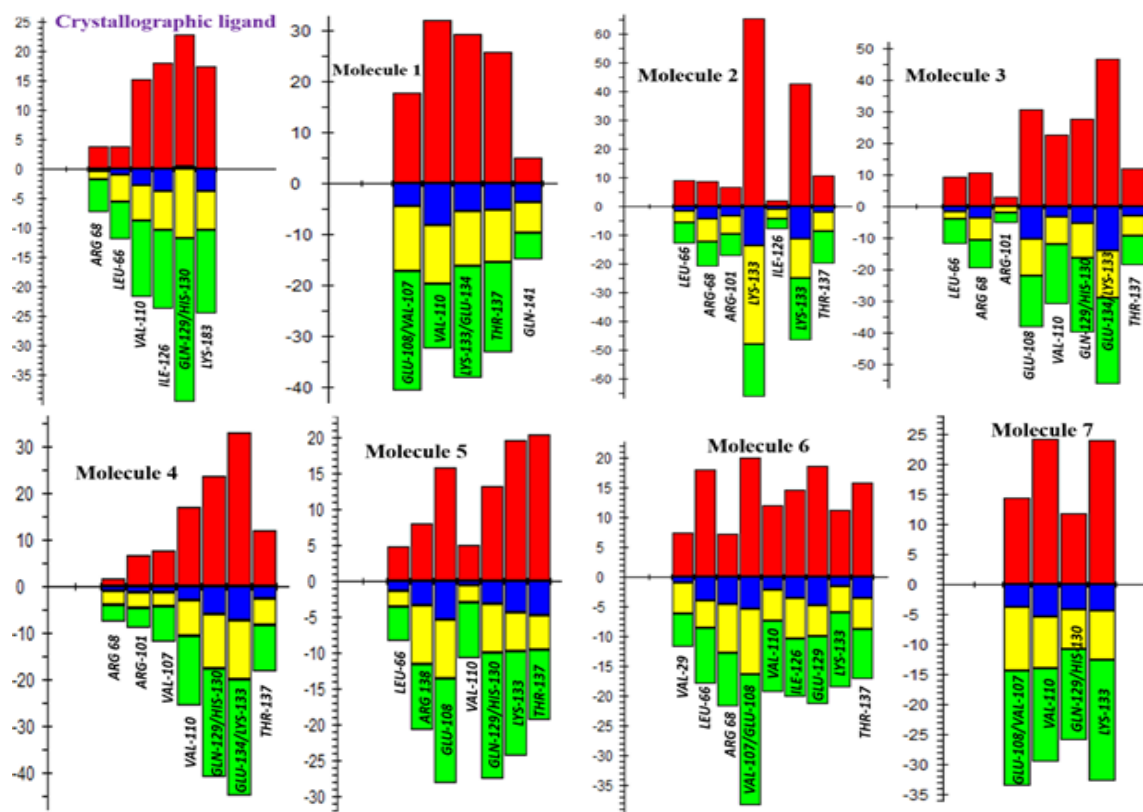


Figure 5. Interaction energies decomposition (PIEDA) in their electrostatic (blue bar), exchange (red bar), charge transfer (yellow bar), and dispersion (green bar) components

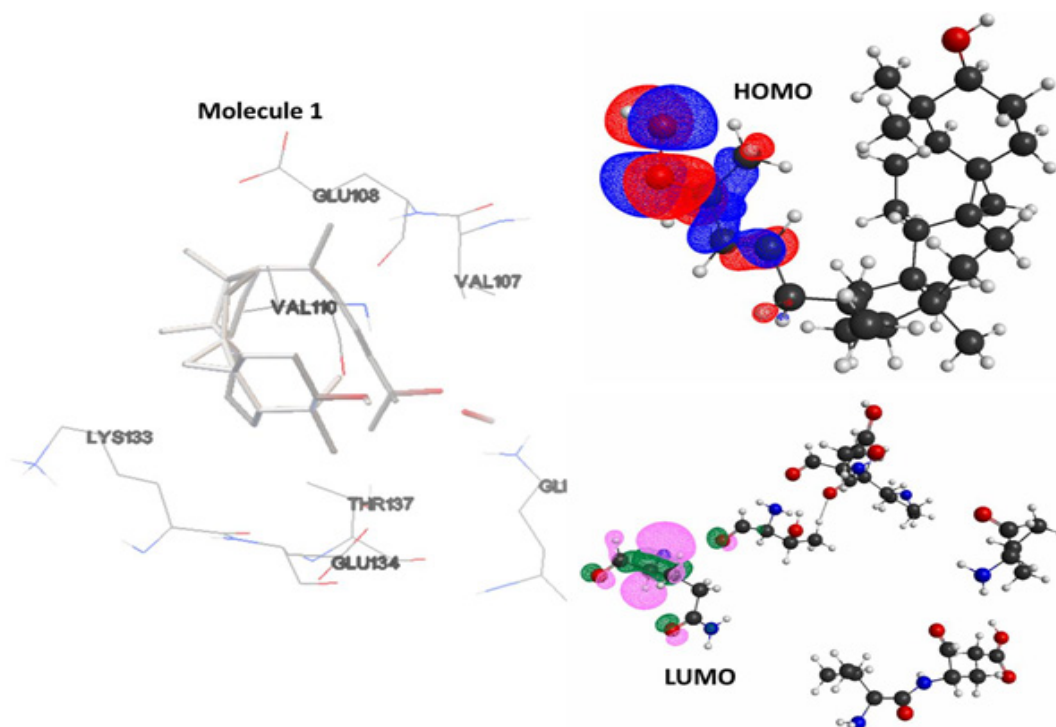


Figure S1. (Left side) Interaction mode between molecule 1 and LOX-5 active site (Top right side). HOMO in molecule 1 (Bottom right side). LUMO in the LOX-5 active site

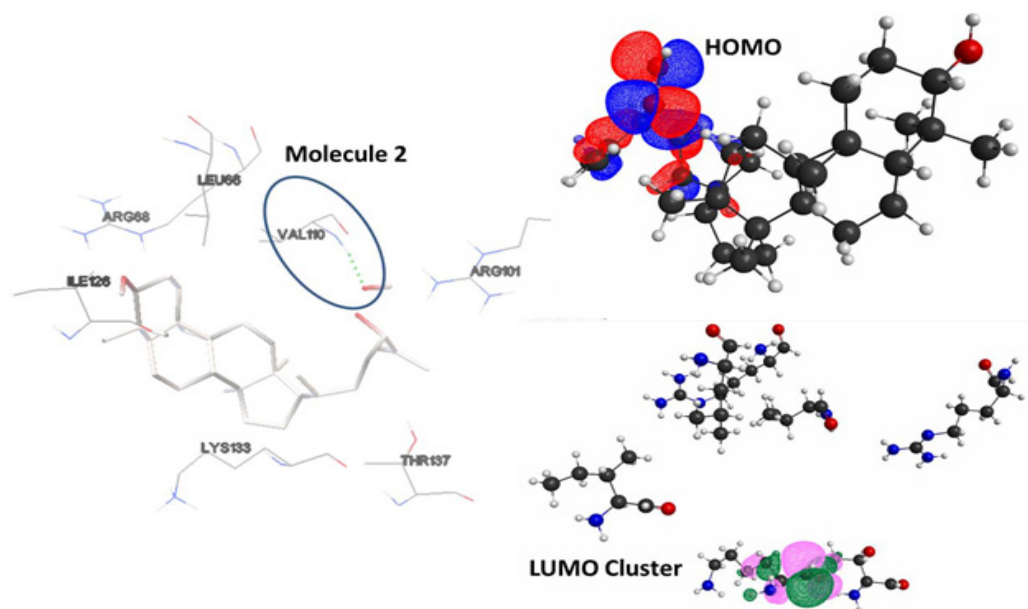


Figure S2. (Left side) Interaction mode between molecule 2 and LOX-5 active site (Top right side). HOMO in molecule 2 (Bottom right side). LUMO in the LOX-5 active site

This modification significantly increases the energy of interaction with VAL-110 (-8.413 kcal/mol). GLU 188 (-7.295 kcal/mol) and ARG-68 (-8.888 kcal/mol) also contribute to the interaction energy. LYS-133 and GLU-134 were the fragments with the most stabilization due to charge transfer and dispersion effects. However, in this case, the LUMO orbital for the ligand-protein complex is located on HIS-130, while the HOMO orbital is extended in the ring system for the molecule 3 (Figure S3). The EI tendencies for molecule 4 are maintained for molecules 4 and 5. For molecule 5, the contribution by the exchange to the interaction energy in THR-137 exceeds the other contributions. It leads to a low energetic destabilization in relation to the remaining fragments (1.149 kcal/mol).

Molecular docking results show that structure 6 showed the best interaction energy (Table IV). Structure 6 shows the highest number of interacting fragments; some of these fragments coincide with those

shown by AKBA. Additional fragments, such as VAL-29, VAL-107, and GLU-108, improve the interaction. For all the fragments, the electrostatic contribution to the interaction energy is significant in relation to the other structures. This trend is also present for charge transfer and dispersion. Hydrogen bonds are formed with VAL-29, ILE-126, LYS-133. The LUMO orbital is located on GLU-108, while the HOMO orbital is located along the ring system in molecule 6 (Figure S4). Finally, molecule 7 shows an aliphatic chain that decreases the number of interacting fragments. Its tendencies are similar to those observed in structure 1.

Conclusion

It was analyzed the bioavailability, bioactivity score, molecular similarity and molecular docking for seven secondary metabolites from *Euphorbia hirta* L., using as reference the structure of allosteric LOX-5 inhibitor 3-acetyl-11-keto-beta-boswellic

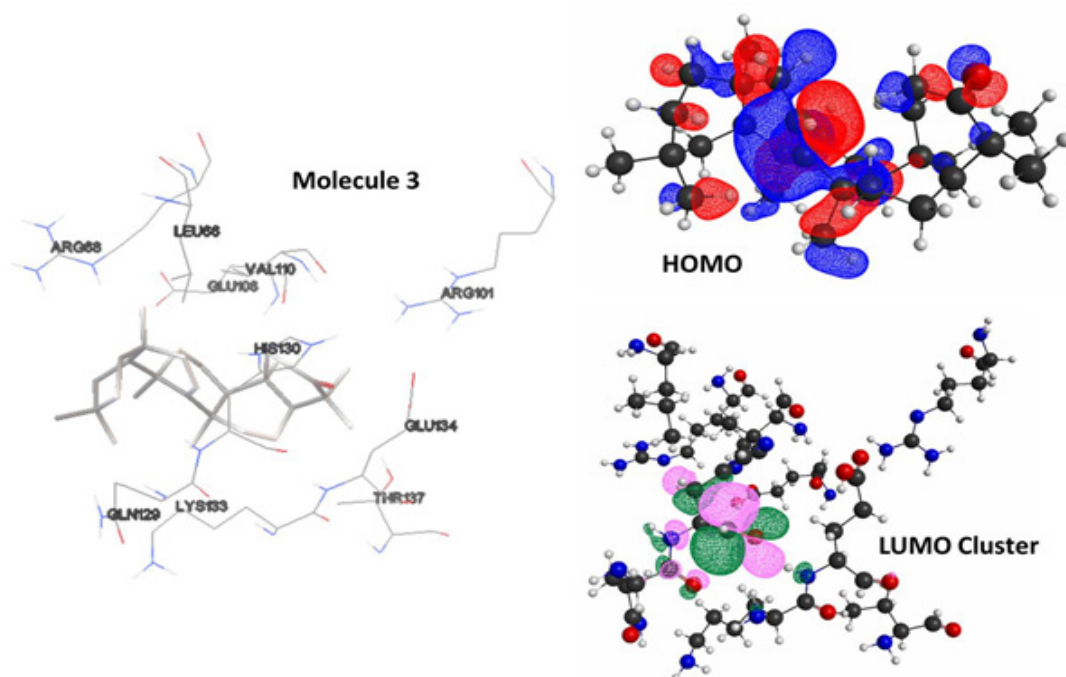


Figure S3. (Left side) Interaction mode between molecule 3 and LOX-5 active site (Top right side). HOMO in molecule 3 (Bottom right side). LUMO in the LOX-5 active site

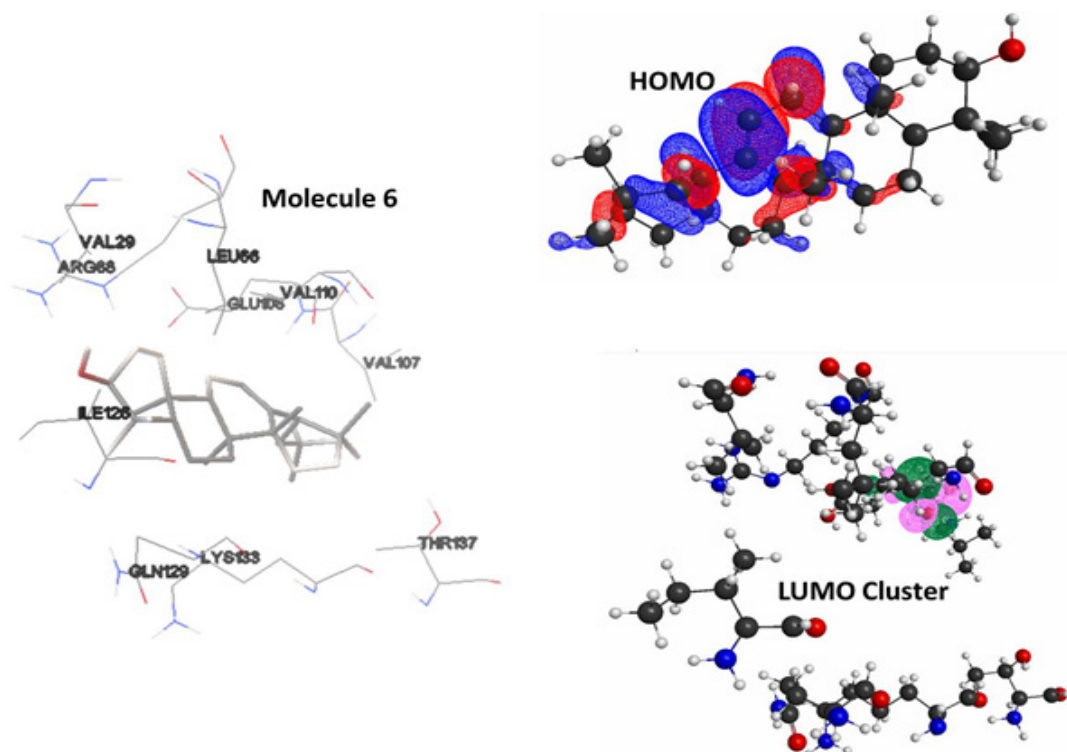


Figure S4. (Left side) Interaction mode between molecule 6 and LOX-5 active site (Top right side). HOMO in molecule 6 (Bottom right side). LUMO in the LOX-5 active site

acid (AKBA). The fragment molecular orbital method (FMO) and pair interaction energy decomposition analysis (PIEDA) were used to evaluate the interaction energy between secondary metabolites and the 5-LOX active site. Log P values of all the secondary metabolites studied were found to be higher than 5, contrary to what was expected with Lipinski's rules of five. However, the triterpenes metabolites studied can act primarily as nuclear receptor ligands and other enzyme inhibitors. Additionally, these molecules also can act moderately as GPCR ligands. The molecules studied have a good shape and ESP similarity with the reference ligand with values of 0.667 to 0.730. Both, AKBA and metabolites ligands were wedged between the two domains of LOX-5, and the main residues contact were LEU-66, ARG-68, VAL-110, HIS-130, ILE-126, GLN, 129 and LYS-133. The PIEDA analysis showed that stabilization in the 5-LOX active site is mainly dominated by hydrophobic interactions, with values up to -35 Kcal/mol. Due to the low presence of terminal -OH groups, electrostatic origin and charge transfer interaction energies are also important, but have values less than 20 Kcal/mol. Our results contribute to the molecular picture of the interaction mechanisms of secondary metabolites in *Euphorbia hirta* L. and reinforce the various experimental results on its possible use in inflammatory processes.

References

- Anzline S, Israel S, Devi N, Sheeba RAJR, Rajkumar PR. 2017. High-resolution synchrotron powder diffraction study on charge density distribution of ampicillin trihydrate. *Chin J Chem Phys* 30: 50-62.
- Anzline C, Israel S, Sujatha K, Sheeba RAJR. 2020. Hirshfeld surface, charge density and site selectivity studies of 1-(2-Methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)-acetone. *Computational and Theoretical Chemistry* 1191: 113044.
- Bender A, Glen AC. 2004. Molecular similarity: a key technique in molecular informatics. *Org Biomol Chem* 2: 3204-3218.
- Bennion BJ, Be NA, McNerney MW, Lao V, Carlson EM, Valdez CA, Malfatti MA, Enright HA, Nguyen TH, Lightstone FC, Carpenter TS. 2017. Predicting a drug's membrane permeability: a computational model validated with *in vitro* permeability assay data. *J Phys Chem B* 121: S228-S237.
- Das K, Basheeruddin Asdaq SM, Saifulla Khan M, Amrutha S, Alamri A, Alhomrani M, Alsanie WF, Bhaskar A, Chandana Shree G, Harshitha P. 2022. Phytochemical investigation and evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of *Euphorbia hirta* ethanol leaf and root extracts: A comparative study. *Journal of King Saud University - Science* 34: 102261.
- Eckert H, Bajorath J. 2007. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug Discov Today* 12: 225-233.
- Fedorov DG, Kitaura K. 2006. Pair Interaction Energy Decomposition Analysis. *Journal of Computational Chemistry* 28: 222-237.
- Fedorov DG, Kitaura K. 2012. Energy Decomposition Analysis in Solution Based on the Fragment Molecular Orbital Method. *The Journal of Physical Chemistry A* 116: 704-719.
- Gadnayak A, Dehury B, Nayak A, Jena S, Sahoo A, Panda PC, Ray A, Nayak S. 2022. Mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by active principles derived from essential oils of Curcuma species: Molecular docking, ADMET analysis and molecular dynamic simulation study. *PLoS One* 17: e0271956.
- Gasteiger J, Marsili M. 1980. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36(22): 3219-3228.
- Ghansenyuy SY, Eyong KO, Yemback P, Mehreen L, Nziko, Vincent de Paul N, Ali Muhammad S. Folefoc GN. 2023. Lipoxygenase inhibition and molecular docking studies of secondary metabolites from the leaves of *Alstonia scholaris*. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 9: 100108.
- Gilbert NG, Gerstmeier J, Schexnaydre EE, Börner F, Garscha U, Neau DB, Werz O, Newcomer ME. 2020. Structural and mechanistic insights into 5-lipoxygenase inhibition by natural products. *Nat Chem Biol* 16: 783-790.

- Grienke U, Mihály-Bison J, Schuster D, Afonyushkin T, Binder M, Guan S-H, Cheng C-R, Wolber G, Stuppner H, Guo D-A, Bochkov VN, Rollinger JM. 2011. Pharmacophore-based discovery of FXR-agonists. Part II: Identification of bioactive triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19(22): 6779-6791.
- Gonzalez R, Mroginski MA. 2019. Fully quantum chemical treatment of chromophore-protein interactions in phytochromes. *J Phys Chem B* 123(46): 9819-9830.
- Hitchcock SA, Pennington LD. 2006. Structure–brain exposure relationships. *J Med Chem.* 49(26): 7559-7583.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 23(1-3): 3-25.
- Liu R, Zhang Y, Li S, Liu C, Zhuang S, Zhou X, Li Y, Zhang Y, Liang JY. 2023. Extraction and preparation of 5-lipoxygenase and acetylcholinesterase inhibitors from *Astragalus membranaceus* stems and leaves. *Journal of Separation Science* 46: 2200812.
- Lončarić M, Strelec I, Moslavac T, Šubarić D, Pavić V, Molnar M. 2021. Lipoxygenase Inhibition by Plant Extracts. *Biomolecules* 11:152.
- Nielsen DS, Shepherd NE, Weijun X, Lucke AJ, Stoermer MJ, Fairlie DP. 2017. Orally Absorbed Cyclic Peptides. *Chemical Reviews* 117(12): 8094-8128.
- Pajouhesh H, Lenz GR. 2005. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx* 2: 541-553.
- Schmidt MW, Baldridge KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JA, Koseki S, Matsunaga N, Nguyen KA, Su S, Windus TL, Dupuis M, Montgomery Jr JA. 1993. General atomic and molecular electronic structure system. *J Comput Chem* 14(11): 1347-1363.
- Molinspiration. 1986. Cheminformatics on the Web. Retrieved from <http://www.molinspiration.com/>
- Muegge I. 2003. Selection criteria for drug-like compounds. *Med Res Rev* 23: 302-321.
- Ochieng PJ, Sumaryada T, Okun D. 2017. Molecular docking and pharmacokinetic prediction of herbal derivatives as maltase-glucoamylase inhibitor. *Asian J Pharm Clin Res* 10(9):19337.
- Pedretti A, Villa L, Vistoli G. 2004. VEGAZZ: an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des* 18(3): 167-173.
- Perri MJ, Weber SH. 2014. Web-Based job submission interface for the GAMESS computational chemistry program. *J Chemical Education* 91: 2206-2208.
- Quynh Vo NN, Nomura Y, Muranaka T, Fukushima EO. 2019. Structure-activity relationships of pentacyclic triterpenoids as inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes. *J Natural Products* 82(12): 3311-3320.
- Rådmark A, Samuelsson B. 2009. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Research* 50: 40-45.
- Ragasa CY, Cornelio KB. 2013. Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11: 0528–0533.
- Shi QW, Su XH, Kiyota H. 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in Genus *Euphorbia*. *Chemical Reviews* 108(10): 4295-4327.
- Shin W-H, Zhu X, Bures MG, Kihara D. 2015. Three-Dimensional Compound Comparison Methods and Their Application in Drug Discovery. *Molecules* 20(7): 12841-12862.
- Schieferdecker S, König S, Koeberle A, Dahse HM, Werz O, Nett M. 2015. Myxochelins target human 5-lipoxygenase. *J Nat Prod* 78(2): 335–338.
- Shi Q-W, Xiao-Hui Su, Hiromasa Kiyota. 2008. chemical and pharmacological research of the plants in Genus *Euphorbia*. *Chemical Review* 108: 4295-4327.
- Siraj MA, Rahman MS, Tan GT, Seidel V. 2021. Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of Triterpenes from *Vernonia patula* with the Cannabinoid Type 1 Receptor. *International J Molecular Sciences* 22(7): 3595.
- Suenaga M. 2005. Facio: New Computational Chemistry Environment for PC GAMESS. *J Computer Chemistry, Japan* 4: 25-32.
- Trott O, Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Computational Chemistry* 31(2): 455-461.
- Vainio MJ, Puranen JS, Johnson MS. 2009. ShaEP: molecular overlay based on shape and electrostatic potential. *J Chem Inf Model* 49(2): 492-502.
- Veber D, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Koppl KD. 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 45(12): 2615-2623.
- Verma RK. 2017. A review - taxonomical study and medicinal uses of *Euphorbia hirta* (Linn.)

- in churu Rajasthan. *World J Pharm Res* 6(10): 1320–2134.
- Wang Q, Qiao X, Qian Y, Li Z, Zhou D, Guo D, Ye M. 2015. Intestinal absorption of ergostane and lanostane triterpenoids from *Antrodia cinnamomea* using Caco-2 cell monolayer model. *Nat Prod Bioprospect* 5: 237–246.
- Yamaguchi H, Yu T, Noshita T, Kidachi Y, Kamiie K, Yoshida K. 2011. Ligand-receptor Interaction between triterpenoids and the hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme predicts their toxic effects against tumorigenic r/m HM-SFME-1 cells *J Biol Chem* 286: 36888–36897.
- Zhao L, Zhou S, Gustafsson JÅ. 2019. Nuclear receptors: recent drug discovery for cancer therapies. *Endocrine Reviews* 40: 1207–1249.



Prevalencia de pacientes con intentos suicidas en la población amazónica, 2019-2024

Prevalence of Patients with Suicide Attempts in the Amazon Population, 2019-2024

MARÍA L CARDOZO SOTO^{*,1}, NATALY B VISTIN GUAMANTAQUI^{**,2}, KARLA J PADILLA FIALLOS^{***,3}

Resumen

Se trata de un estudio descriptivo, unicéntrico, retrospectivo sobre prevalencia en 5 años en la población amazónica de Ecuador, cuyos diagnósticos fueron intento de suicidio debido a lesiones y envenenamiento autoinfligido. Se investigaron variables epidemiológicas y se describen comorbilidades y situaciones coadyuvantes que influyeron en los pacientes en estudio. Se incluyó a una población de 253 pacientes, sin embargo, se revisaron 170 historias. Los pacientes ingresaron al estudio provenientes de 2 provincias del Ecuador (Napo y Orellana), predominó en un 95% la población de Napo. Al igual que la literatura internacional, el mayor porcentaje de pacientes fue de predominio masculino (57%). El análisis mediante Chi-Cuadrado indica que la etnia indígena tiene mayor tendencia suicida y que las pacientes femeninas en el rango de 12 a 18 años también. Se concluye que la problemática debe ser abordada por un equipo multidisciplinario que incluya personal de salud, educadores, antropólogos, sociólogos para aportar soluciones en este tipo de conductas en la población amazónica del Ecuador.

Palabras clave: Suicidio, Indígenas, Amazonia, muerte autoinfligida

Abstract

This is a descriptive, single-center, retrospective study on 5-year prevalence in the Amazonian population of Ecuador, whose diagnoses were attempted suicide due to injuries and self-inflicted poisoning. Epidemiological variables were investigated, and comorbidities and contributing situations that influenced the patients under study were described. A population of 253 patients was included; however, 170 records were reviewed. The patients entered the study from 2 provinces of Ecuador (Napo and Orellana), 95% of which were the population of Napo. Like the international literature, the highest percentage of patients was predominantly male (57%). The analysis using Chi-Square indicates that the indigenous ethnic group has a greater suicidal tendency and that female patients in the range of 12 to 18 years as well. It is concluded that the problem must be addressed by a multidisciplinary team that includes health personnel, educators, anthropologists, and sociologists to provide solutions to this type of behavior in the Amazonian population of Ecuador.

Keywords: Suicide, Indigenous, Amazonia, self-inflicted death

*Médico Tratante. Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena Provincia de Napo, Ecuador. **Médico Residente. Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital José María Velasco Ibarra de la ciudad de Tena Provincia de Napo, Ecuador. ***Médico Residente de post grado de Psiquiatría Universidad UTE Quito Ecuador. Correspondencia: luzthmin@gmail.com

Orcid: [0000-0001-6490-2490](https://orcid.org/0000-0001-6490-2490)

[0009-0003-6796-9422](https://orcid.org/0009-0003-6796-9422)

[0000-0003-2606-6377](https://orcid.org/0000-0003-2606-6377)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.7)

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

Recepción: 10/08/2024

Aprobación: 27/09/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 198-208. 2024

Introducción

Cada año, más de 703.000 personas se quitan la vida tras numerosos intentos de suicidio, lo que corresponde a una muerte cada 40 segundos. El tercer informe regional sobre la mortalidad por suicidio, publicado en marzo de 2021, indicó que este problema sigue siendo una prioridad de salud pública en la Región de las Américas. Los suicidios son prevenibles con intervenciones oportunas, basadas en la evidencia y a menudo de bajo costo. En junio de 2021, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó LIVE LIFE – VIVIR LA VIDA (por sus siglas en inglés), una guía de implementación que consta de cuatro intervenciones clave, para prevenir el suicidio en todo el mundo. Un enfoque multisectorial es fundamental para involucrar a la sociedad y a las partes interesadas en un esfuerzo de colaboración (<https://www.paho.org/es/temas/prevencion-suicidio>).

Actualmente las intenciones suicidas son vistas en edades tan tempranas como la población infantil, hasta los adultos más longevos. La ideación suicida es común en los adolescentes. Una encuesta representativa a nivel nacional de 2015 entre estudiantes de secundaria ($n > 15,000$) en los Estados Unidos encontró que la prevalencia de ideación suicida a los 12 meses fue del 18 por ciento, y la prevalencia de planificación de un intento de suicidio fue del 15% (Kairi y Leo De, 2014; Pelkonen y Marttunen, 2017).

En Latinoamérica se reportan registros de muerte por suicidio, los registros forenses oficiales dan cuenta de 61 muertes por suicidio de indígenas colombianos durante 2010 y 2014, cuyo 68% corresponde a

personas entre 15 y 24 años (Tuesta Cerrón y col., 2012). Así, se evidencia que este problema constituye la causa principal de muerte entre adolescentes y jóvenes indígenas en Colombia y el mundo (Vargas-Espinola y col., 2017).

También en Ecuador, el suicidio es un problema de salud pública importante, pues cada año más de mil ecuatorianos se quitan su propia vida, correspondiendo aproximadamente la mitad de los suicidios a jóvenes y adolescentes menores de 30 años y haciendo que Ecuador se encuentre entre los 10 países con mayor incidencia de muertes autoinfligidas en jóvenes a nivel mundial (Vargas-Espíndola y col., 2017). Los suicidios representan el 1,7% de las muertes que ocurren en el país anualmente (Castro, 2019). La muerte autoinfligida entre el año 2015 y 2018 supera las cifras de muerte por agresión interpersonal y la mayoría de sus víctimas se encontraban entre 15 a 40 años (Castro, 2019).

Con estos antecedentes nos planteamos realizar un estudio para investigar la prevalencia de pacientes que ingresaron al centro de referencia amazónico de la ciudad del Tena en la provincia de Napo Ecuador; en el Hospital José María Velasco Ibarra, entre enero de 2019 a enero de 2024, con los diagnósticos de intento de suicidio. El objetivo fue conocer las variables epidemiológicas tales como edad, sexo, etnia, comorbilidades y/o situaciones coadyuvantes. Adicionalmente conocer el porcentaje de pacientes que ameritaron el apoyo de la Unidad de cuidados intensivos (UCI) para restablecer su salud.

La población de este estudio se ubicó, en la matriz de egresos del hospital de cada año, con verificación de las historias

encontradas con las variables de estudio. Se plantearon las siguientes interrogantes:

- ¿Pertener a una etnia indígena implica mayor tendencia al suicidio?
- ¿Existe entre el grupo de 12 a los 18 años mayor predominio con conducta suicida según el sexo?

Materiales y Métodos

Es un estudio descriptivo, unicéntrico, de cohorte transversal y retrospectivo que abarcó la población atendida desde enero de 2019 hasta enero de 2024 (5 años) cuyo diagnóstico fue lesión autoinfligida intencionalmente, auto envenenamiento o intento de suicidio. Para ello se solicitó autorización por parte de las autoridades del hospital, y jefatura de los servicios de Docencia y Estadística del Hospital José María Velasco Ibarra (HJMVI). Se realizó la preparación de bases de datos donde se incluyeran las siguientes variables:

1. Total de pacientes consultados en cada año; 2. Total, de pacientes con los diagnósticos en estudio; 3. Porcentaje de pacientes de cada año con el diagnóstico; 4. Autoidentificación; 5. Edad; 6. Sexo; 7. Procedencia; 8. Fecha de Ingreso; 9. Diagnóstico Principal; 10. Comorbilidades; 11. Situaciones Adyuvantes.

Al ser un estudio descriptivo, el tamaño total de la muestra fue en base a estimaciones del número de casos mediante la realización de revisiones de estadísticas hospitalarias, buscando la disponibilidad de códigos de diagnóstico específicos de interés.

Para la determinación de la tasa bruta de egresos, se utilizó la matriz de egresos del

Hospital José María Velasco Ibarra (HJMVI), por año. El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo con la cantidad total de pacientes con los diagnósticos buscados. Debido a que el diseño del estudio es retrospectivo, no intervencionista y el análisis anónimo de los datos, el estudio no es una investigación en humanos, por lo que no fue necesario obtener del Comité de Ética Médica el consentimiento para la recopilación, análisis y publicación de los datos por parte de los pacientes.

Para las variables establecidas se estableció lo siguiente:

- Etnia, según la matriz, la autoidentificación de cada paciente se anota como indígena, mestizo, afrodescendiente u otro.
- Edad: agrupado en cuantiles de 4 años a partir de los 11 años hasta más de 65 años.
- Procedencia: de provincia, cantones y parroquias.
- Fecha de ingreso: para establecer la mayor afluencia durante los 5 años
- Comorbilidades: se refiere a los antecedentes de patología previa tales como diabetes, hipertensión, alcoholismo, tabaquismo, drogas ilícitas, enfermedades mentales previas, HIV.
- Situaciones coadyuvantes: violencia doméstica, abuso sexual, abortos durante el episodio de hospitalización, conflicto familiar, problemas económicos.
- Pacientes que ingresaron a la UCI se resumen en las Tablas IV y V, donde

se analizan los requerimientos de soporte vital y sus scores de gravedad.

- Para la respuesta a las hipótesis nulas se utiliza la prueba de Chi-Cuadrado para un intervalo de confianza de 0,05.
- Mortalidad se determinó por el número de fallecidos, sin embargo, se tiene subregistro debido a que los pacientes o sus familiares solicitaron la alta voluntaria antes del desenlace.

Resultados

De acuerdo con la información administrada de la matriz de egresos de los 5 años, ingresaron al Hospital José María Velasco Ibarra, entre enero de 2019 a enero de 2024, un total de 253 pacientes con diagnóstico de lesión o envenenamiento autoinfligidas. Se planteó la evaluación del total de las historias clínicas, sin embargo, debido a cambios realizados en el servicio de estadísticas del hospital no se logró este objetivo. Se realiza el cálculo de la muestra, para un índice de confianza del 95% con un margen de error de 5 %, obteniéndose que se requieren 150 sujetos de estudio. Se emplearon 170 historias clínicas, lo que constituye en 67% de la población ingresada.

En la Tabla I se describe el total de pacientes egresados en los 5 años, los pacientes y la cantidad de intento de autolisis con su respectivo porcentaje para cada año. En el Gráfico 1 se muestra el aumento progresivo por año, sin embargo, el año 2024 solo se informa los pacientes ingresados en el mes de enero.

En la Tabla II se muestra la distribución de la población estudiada en cada año de acuerdo con el sexo.

Como se observa en el Gráfico 2, los diagnósticos principales fueron: el envenenamiento (89%) y las lesiones autoinfligidas (11%). En una revisión más detallada dentro de los principales agentes utilizados se encuentran: los herbicidas tipo Paracuat, plaguicidas y fármacos varios, tales como benzodiazepinas, antidepresivos, anticonvulsivos y analgésicos antiinflamatorios. Las causas más relevantes lesiones autoinfligidas fueron lesiones con objetos cortantes, la asfixia por estrangulamiento y ahorcamiento, además de caída de altura (Gráfico 3). De acuerdo con el sexo se evidencia en los 5 años, que los hombres predominan con un 57 % de intento autolítico vs. 43% de las mujeres (Gráfico 4). La distribución por la edad, para los 5 años, indica que predominan los adultos jóvenes (Gráfico 5). La edad promedio es menor a los 30 años (Tabla III).

En cuanto a la etnia, se observa un mayor porcentaje de indígenas con intento de suicidio, en un 68% vs. los autoidentificados como mestizos (Gráfico 6).

En relación con la procedencia, se conoce que Ecuador políticamente se divide en provincias y estas se dividen en cantones y estos en parroquias. Así, los pacientes procedían de las provincias de Napo y Orellana, de los cuales el 95% fueron de Napo y 5% de Orellana. En el caso de la provincia de Napo de los 2 cantones que más se recibió pacientes fueron cantón Tena con un 70% y cantón Archidona con un 20%, La distribución por parroquias se muestra el cantón Tena (Gráfico 7).

De acuerdo con la fecha de ingreso, durante los 5 años, hubo mayor afluencia de casos en los meses de diciembre, enero y junio, se planteó como causa las fiestas

Tabla I.

Total de pacientes atendidos y porcentaje de pacientes con el diagnóstico de intento de suicidio

Año	Total, de pacientes atendidos	Hombres	Mujeres	Sujetos de estudio	Porcentaje de casos en relación al total
2019	7432	2157	5275	46	0.61 %
2020	13.019	8576	4344	28	0.21 %
2021	6160	1481	4679	52	0.84 %
2022	6528	1579	4949	54	0.82 %
2023	6802	1935	4867	67	0.98 %
2024	604	188	416	6	0.99 %

Fuente: matriz de egresos del HJMVI de cada año

decembrinas y la finalización del año escolar (Gráfico 8).

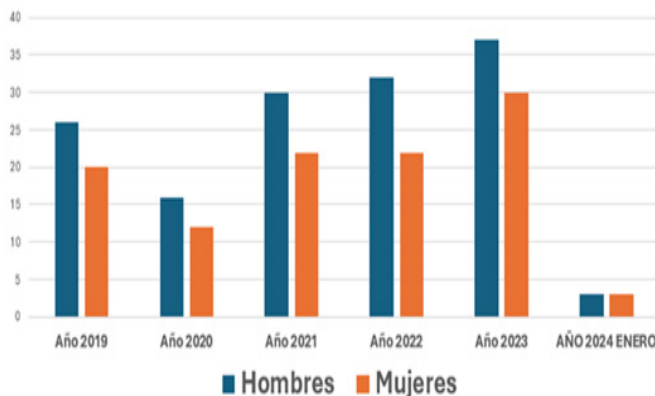


Gráfico 1. Aumento progresivo de número de casos por año

En el Gráfico 9 se muestran las comorbilidades. Estas incluyeron: 1. La neumonía ocurrida durante la hospitalización. 2. Fallo renal refiere a trastornos agudo que no amerito uso de diálisis. 3. Trastorno mental engloba aquellos expuesto por el psiquiatra tales como: ansiedad, depresión mayor, depresión con trastornos psicóticos, esquizofrenia, en la historia del paciente. 4. Enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial o cardiopatías previas ya conocidas. 5. Drogadicción: dicho por el paciente o por historias previas ya conocidas. 6. Los hábitos alcohólicos, se refiere a que fueron expresados en la historia

como usado durante el evento actual. 7. Las historias de intentos autolíticos se refiere a los intentos de envenenamiento o lesiones autoinfligidas previamente antes del suceso actual.

En cuanto a los factores coadyuvantes estos se refieren a los expuestos por el paciente que contribuyeron a la toma de decisión (Gráfico 10). Llama la atención la falta de apoyo familiar o la violencia doméstica, los cuales constituyen un 81% de los factores que condicionaron la conducta suicida, seguido del abuso sexual y problemas económicos.

En la Tabla IV se muestran los pacientes que ingresaron a la UCI, los cuales un 41,17% fueron indígenas; el 70,5% fueron hombres. En 5 años de los ingresados a UCI fallecieron el 8,8% de los pacientes.

La Tabla V resume los scores de gravedad.

Se plantea: ¿Pertener a una etnia indígena implica mayor tendencia al suicidio?

HIPÓTESIS NULA

La etnia no es relevante para este tipo de conducta ya que estas decisiones son

Tabla II.
Distribución de la población estudiada en cada año de acuerdo con el sexo

	2019	2020	2021	2022	2023	2024	total
HOMBRES	26	16	30	32	37	3	144
MUJERES	20	12	22	22	30	3	109
TOTAL	46	28	52	54	67	6	253
ENCONTRADOS	10	9	46	47	54	4	170
% encontrados	21,73%	32,14%	88,46%	87,03%	80,59%	66,66%	67,19%

Fuente: Dra. María Cardozo

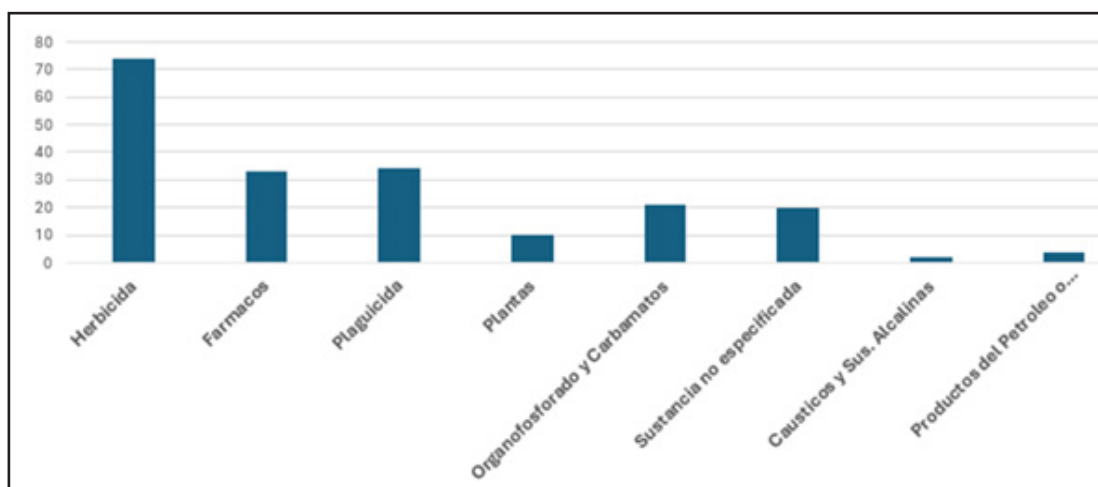


Gráfico 2. Principales agentes usados para envenamiento autoinfligido

multivariantes de acuerdo con el entorno del paciente.

Se realizaron los cálculos de Chi-Cuadrado para un intervalo de confianza de 0,05.

En vista del Chi-Cuadrado es mayor al valor crítico 11,07 se rechaza la hipótesis nula, por lo que ser de etnia indígena si es relevante para presentar la tendencia al suicidio.

La segunda interrogante fue: ¿Existe entre el grupo de 12 a los 18 años mayor

predominio con conducta suicida según el sexo? La hipótesis nula: las pacientes femeninas entre las edades de 12 a 18 años si tienen mayor conducta suicida, por las condiciones propias de esta etapa.

En vista que el Chi-Cuadrado es menor al valor crítico 11,07 se acepta la hipótesis nula, por lo que el sexo femenino si afecta la conducta suicida entre el grupo de 12 a 18 años.

La Tabla VI muestra el número de fallecidos por año, siendo el mayor porcentaje de 9,26 en el año 2022.

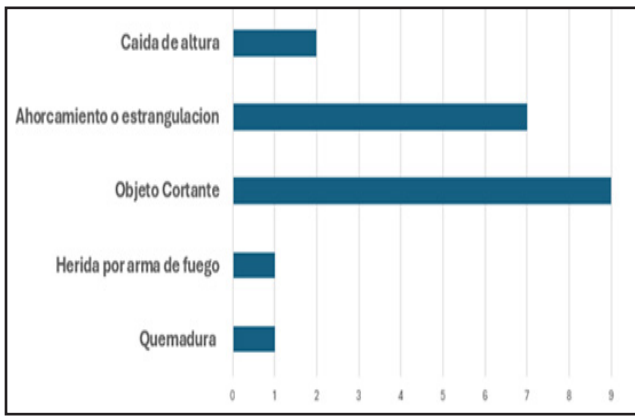


Gráfico 3. Lesiones autoinfligidas

Tabla III.
Edad promedio

Año	Edad promedio
2019	24,60
2020	25,59
2021	27,77
2022	25,56
2023	28,67
2024	26,62
Promedio general	26,46

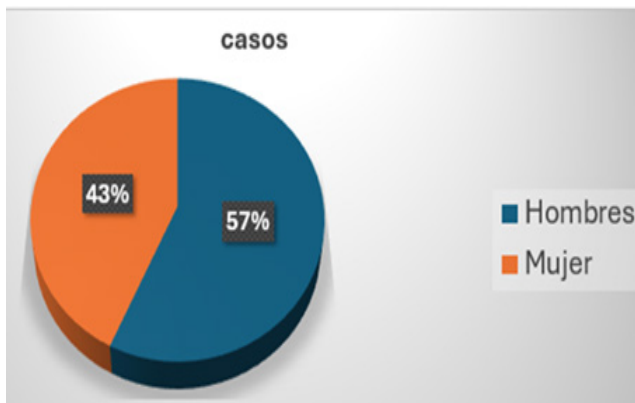


Gráfico 4. Distribución por sexo

Discusión

En los últimos 5 años se observa un aumento porcentual de los pacientes con diagnóstico de intento suicida, sus causas principales fueron envenenamiento y lesiones autoinfligidas. Dentro de los envenenamientos predominan los herbicidas especialmente el Paracuat, y en el caso de lesiones, las heridas con objetos cortantes y la asfixia por ahorcamiento.

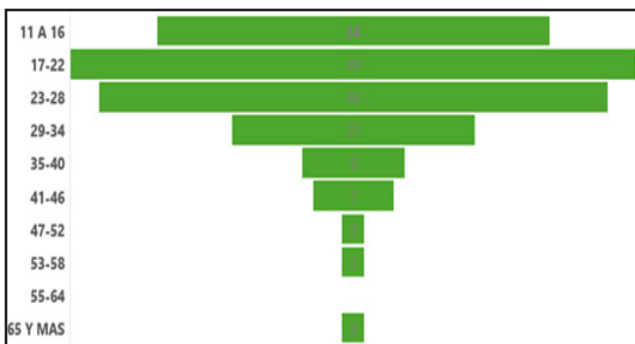


Gráfico 5. Distribución de los pacientes por edades

Es importante señalar que los pacientes sin pronóstico solicitaron altas voluntarias, para fallecer en su domicilio.

En cuanto a la distribución por sexo, predominan con un 57% los hombres sobre el 43% de las mujeres, cuyas edades predominan principalmente entre adultos jóvenes y adolescentes. Se pudo determinar que la etnia indígena tiene mayor conducta suicida ($p < 0,05$). Vargas-Espíndola y col., 2017, mostraron que el suicidio en indígenas jóvenes tiene que ver con altos niveles de exposición a violencia intrafamiliar, desempleo, estructuras familiares cambiantes, pérdidas traumáticas, consumo de sustancias psicoactivas, procesos de desculturización secundarios a opresión, racismo, discriminación y falta de competencia

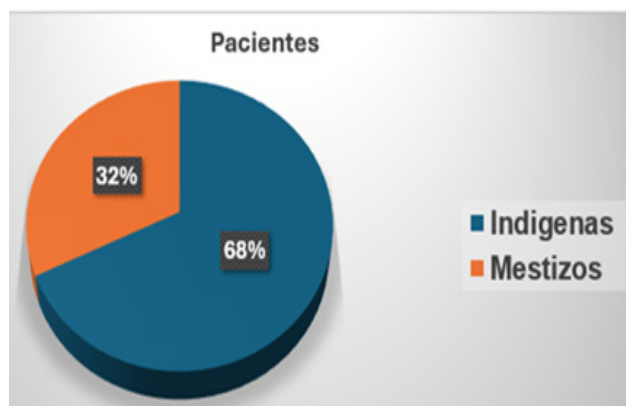


Gráfico 6. Porcentaje de pacientes según la etnia

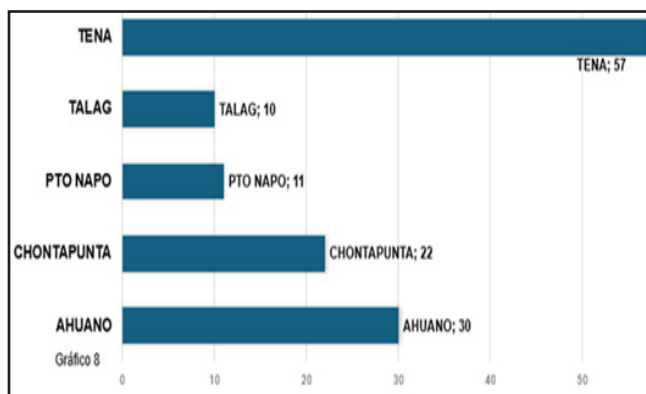


Gráfico 7. Procedencia en el cantón Tena

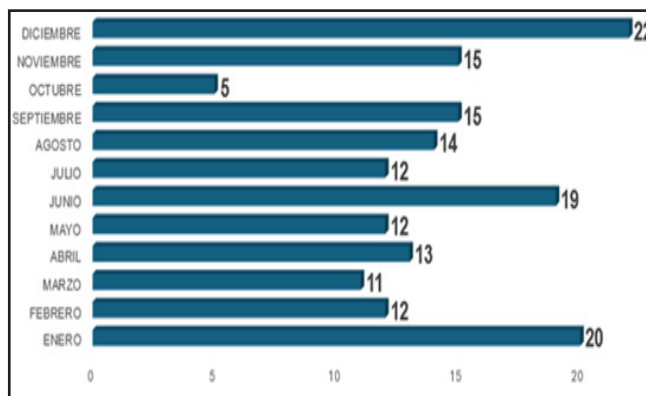


Gráfico 8. Distribución de los pacientes por mes en 5 años

intercultural para su atención (Collinson, Copolov, 2004; Vargas-Espíndola y col., 2017). En el caso de la edad adolescente, el suicidio predomina en el sexo femenino entre los adolescentes entre 12 a 18 años ($p < 0,05$), esto se asemeja a lo encontrado

en los lineamientos de atención al paciente en Ecuador donde expresan que en las áreas rurales un 52% de los suicidios se presentan en las mujeres y recaen en niñas y adolescentes entre 9 a 19 años, mientras que en el área urbana solamente 27% de los suicidios en mujeres corresponden a ese grupo de edad. En los hombres, en el área urbana, solamente el 14% de los suicidios ocurre entre los 9 a 19 años, siendo en área rural el 34% (Chenhall, 2009).

Este estudio fue realizado con un 95% de ingresos de pacientes de la Provincia de Napo, con un 70% del cantón Tena cuyas parroquias más afectadas son Tena (44%), Ahuano (23%) y Chontapunta 17%. Por otra parte, se evidencia que entre los meses de diciembre, enero y junio predomina el ingreso de estos pacientes.

Dentro de las comorbilidades de la población estudiada, predominan los trastornos mentales, expuestos en las historias por el psiquiatra como: ansiedad, depresión mayor, depresión con trastornos psicótico y esquizofrenia, además de los hábitos acentuados de alcoholismo.

Los factores coadyuvantes que se encuentran en la historia y reportadas por los pacientes en las consultas posterior al evento, que indujeron al sujeto a la decisión del intento autolítico fueron la falla de apoyo familiar, la violencia domestica (81%) seguido del abuso sexual y problemas económicos.

Fueron 85 pacientes del total del universo de 253 pacientes (33,5%) que ingresaron a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) en los 5 años, entre ellos el 41,17% fueron indígenas y el predominaron los hombres (70,5%). De estos pacientes fallecen en los 5 años un 8,8%.

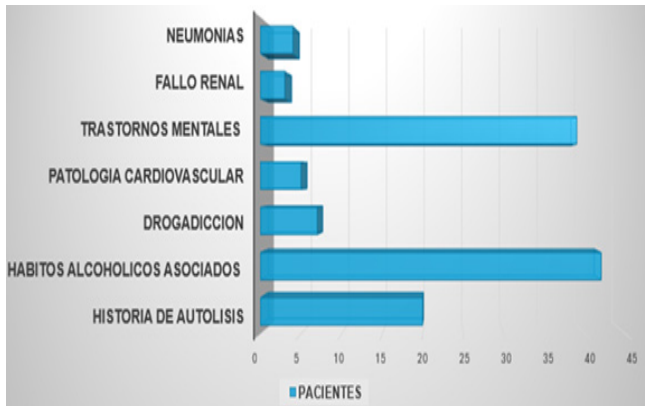


Gráfico 9. Comorbilidades

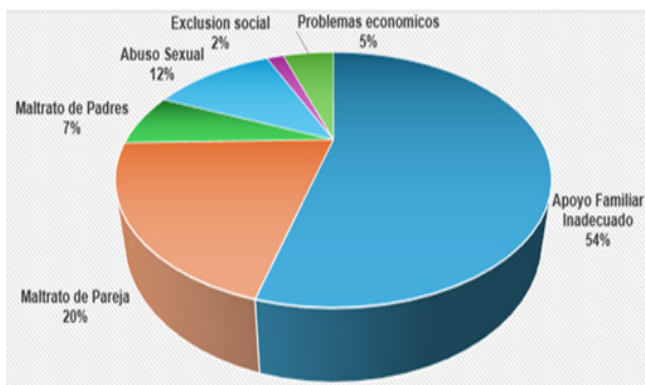


Gráfico 10. Principales factores adyuvantes que contribuyeron a la decisión de los pacientes

La mortalidad en general en los 5 años es menor a 6% en los 4 años, ya que para el mes de enero de 2024 se desvía a 20% por tratarse de un tiempo de un mes.

Existe una tendencia a la autolisis como tal, entre los pueblos amerindios, la cual sobrepasa a la incidencia de la población general (Vargas-Espíndola y col., 2017). Los pueblos indígenas de todo el mundo siguen sufriendo como resultado de tasas de pobreza desproporcionadamente elevadas, problemas de salud, delincuencia y violaciones de los derechos humanos, y muestran 62% más de probabilidades de cometer suicidio que la población general. De igual manera las Naciones Unidas ya menciona este fenómeno

Tabla IV.
Cantidad de pacientes que ingresaron a la UCI por año

AÑO	PACIENTES	HOMBRES	MUJERES	INDIGENAS	FALLECIDOS
2019	5	2	3	1	0
2020	3	2	1	0	0
2021	8	7	1	5	
2022	6	4	2	2	1
2023	11	8	3	6	2
ENERO 2024	1	1			0
TOTAL	34	24	10	14	3

Tabla V.
Score de gravedad y otros datos

AÑO	APACHE	SOFA	PROMEDIO DE HOSP	VENTILADOS	DIAS EN VM	TRAQUEOSTOMIAS	TRASLADO A 3ER NIVEL
2019	6%	26%	3,25	1	0	0	1
2020	28%	33%	2	2	1,5	0	1
2021	33,4%	32,4%	5,5	8	4,25	1	0
2022	25,16%	29%	6	5	1,5	0	1
2023	36%	32%	5,3	9	3,72	0	0
ENERO 2024	15%	33%	5	1	3	0	0

Tabla VI
Porcentaje de mortalidad total por año

AÑO	NUMERO DE PACIENTES	PORCENTAJE
2019	2	4,34%
2020	2	7,14
2021	3	5,76
2022	5	9,25
2023	4	5,97
2024 (ENERO)	1	16,6

secundario a efectos de la discriminación, colonización a la fuerza y desvanecimiento de tradiciones ancestrales, además de afectar principalmente a la población joven y adolescente (Tuesta Cerrón y col., 2012; Rivas Toledo y Lara Ponce, 2001).

La evidencia coincide con el presente estudio en cuanto a la etnia indígena, derivado de varios factores como lo son, el tipo de poblaciones, sus características demográficas y un factor muy importante que hay que considerar, La Universidad Central del Ecuador, describe un factor que contribuye al suicidio en poblaciones amazónicas: vivir cerca de casos de suicidio o haber sido afectado por estos; este particular se asocia a otros fenómenos que son sinérgicos con el fenómeno del suicidio (Acuña, 2021).

Conclusiones

El presente trabajo está en línea con la evidencia que indica la mayor prevalencia de los intentos suicidas, y los métodos utilizados para el mismo. Además, que ser de la etnia indígena tiene influencia con la conducta suicida, es de gran relevancia ya que en Latinoamérica se cuentan con muy pocos estudios enfocados a esta población. Se plantea la inquietud para desarrollar futuros estudios desde un enfoque intercultural permitiendo detectar factores de vulnerabilidad, conservando su herencia cultural, tradiciones y manteniendo su cosmovisión, con la finalidad de que el equipo de salud tenga un abordaje holístico desde un enfoque transcultural valorando la identidad, fomentando la resiliencia, sentido de pertenencia. El grupo etario que se presenta es la adolescencia de 12 a 18 años, el sexo femenino tiene mayor tendencia al suicidio, por lo que es necesario aplicar proyectos con enfoque de género. Se encontró mayor afluencia de casos entre los meses de diciembre, enero y junio. Consideramos que, pese a que los esfuerzos que se han realizado por disminuir estas cifras durante estos

años es necesario incrementar los esfuerzos con un abordaje multidisciplinario para la prevención desde la infancia que incluya profesionales de salud mental, educadores, sociólogos y antropólogos por ser un problema social de gran impacto en todos los niveles. La fortaleza del presente estudio es la duración de 5 años y la debilidad es el subregistro de la información.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Acuña A. 2021. El Suicidio de Eppa, Mujer Huaorani de la Amazonia Ecuatoriana. *Revista de Antropología de la Universidad de Ganada* 16(3).
- Castro M. 2019. Bioestadística aplicada en investigación clínica: conceptos básicos. *Revista Médica Clínica Las Condes* 30(1) 50-65 .
- Chenhall RD. 2009. Those young people all crankybella. *The International Journal of Management and Humanities (IJMH)* 38(3):28-43.
- Collinson S, Copolov D. 2004. Challenges and opportunities for mental health research in Australia. *J MentHealth* 13(1):29-36.
- Gerstner RMF, Soriano I, Sanhueza A, Caffé S, Kestel D. 2018. Epidemiología del suicidio de adolescentes y jóvenes en Ecuador. *Rev Pan Am Salud Pública* 42:e100.
- INMLCF. Suicidio de Indígenas en Colombia, 2010-2014. Bogotá D.C.: INMLCF. 2015 Available from: Available from: <https://goo.gl/zbkTVJ>.
- Kairi K, Leo D De. 2014. Regions with the Highest Suicide Rates for Children and Adolescents—Some Observations. *J Child Adolesc. J Child Adolesc Behav* 2: e104.
- Kann L, McManus T, Harris WA, Shanklin SL, Flint KH, Hawkins J, Queen B, Lowry R, Olsen EO, Chyen D, Whittle L, Thornton J, Lim C, Yamakawa Y, Brener N, Zaza S. 2016. Youth Risk Behavior Surveillance - United States, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*

- (MMWR) 65(6): 1-172.
- Lineamientos operativos para la Atención en las Unidades de Salud. Mental Hospitalarias. 2016. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/09/Lineamiento-de-intencion-e-intentos-de-suicidio.pdf>
- Mergl R, Koburger N, Heinrichs K, Székely A, Tóth MD, Coyne J, Quintão S, Arensman E, Coffey C, Maxwell M, Värnik A, van Audenhove C, McDaid D, Hegerl U. 2015. What are reasons for the large gender differences in the lethality of suicidal acts? An epidemiological analysis in four european countries. PLoS One 10(7):e0129062.
- OMS. 2018. Suicidio. En <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/suicide>
- OPS. Prevención del Suicidio, Disponible: <https://www.paho.org/es/temas/prevencion-suicidio>
- Pelkonen M, Marttunen M. 2003. Child and adolescent suicide: epidemiology, risk factors, and approaches to prevention. Paediatr Drugs 5(4):243-65.
- Rivas A, Rommel L. 2001. INEC Defunciones Generales. 2018. Available from: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/nacimientos_y_defunciones/
- Rivas Toledo A, Lara Ponce R. 2001. Conservación y petróleo en la Amazonía Ecuatoriana. Un acercamiento al caso huaorani. https://digitalrepository.unm.edu/abya_yala/40
- Rojas Hinostroza JS. 2023. Depresión postparto: características socioculturales y apoyo de la pareja (Tesis). Disponible: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2021/12/1028446/469-manuscrito-anonimo-891-1-10-20180417.pdf>
- Tuesta Cerrón I, García Tuesta M, García Hierro P, Ramírez Machado I, Beldi de Alcantara ML, Trajber Z, Tobón Yagari LM, Tobón Yagari MP. 2012. Suicidio adolescente en pueblos indígenas: tres estudios de caso. Panamá: Unicef. Disponible: https://www.unicef.org/brazil/media/3766/file/Suicidio_Adolescente_em_Povos_Indigenas.pdf
- Vargas-Espíndola A, Villamizar-Guerrero JC, Puerto-López JS, Rojas-Villamizar MR, Ramírez-Montes OS, Urrego-Mendoza ZC. 2017. Conducta suicida en pueblos indígenas: una revisión del estado del arte. Revista de la Facultad de Medicina 65(1): 129-35.
- Wasserman D, Cheng Q, Jiang G. 2005. Tasas globales de suicidio entre jóvenes de 15 a 19 años. World Psychiatry 4 (2):114–120.



Estandarización de PCR múltiple para identificación simultánea de los patógenos *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* en queso blanco

Standardization of multiplex PCR for simultaneous identification of the pathogens *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* in white cheese

MARÍA G. CESTARI^{*1}, MARIAM OTERO^{*2}, MARÍA G. TORRES^{*3}, GRICELIS P. MARTÍNEZ^{**4},
MARÍA I. CALDERÓN^{*}, MICHAEL R. MUJARES^{**5}

Resumen

La técnica de PCR múltiple (mPCR) constituye una alternativa rápida y específica para la identificación y la detección de agentes etiológicos y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez. Esta técnica forma parte de las herramientas analíticas que permiten la identificación de los patógenos transmitidos por los alimentos, siendo alternativas económicas, seguras y confiables para su aplicación en la industria alimentaria y los laboratorios de control. El objetivo fue estandarizar un método de PCR múltiple para identificar simultáneamente, en una misma mezcla de reacción, las bacterias patógenas *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) en una matriz de queso contaminada artificialmente y posteriormente enriquecida en agua peptonada. La dilución que reportó entre 10 y 250 UFC, fue la seleccionada para realizar la extracción de ADN, siendo esta la dilución la de 1×10^{-4} . Las bandas de los cultivos puros y de la PCR múltiple fueron detectadas mediante electroforesis utilizando un transiluminador UV. La estandarización del método para la matriz de queso se realizó inoculando la matriz con los microorganismos de interés, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, y la presencia de éstos se determinó luego a través de la PCR múltiple.

Palabras clave: mPCR, ADN, queso, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*

Abstract

The multiplex PCR (mPCR) technique is a rapid and specific alternative for identifying and detecting etiological agents and their virulence and resistance genotypes with great sensitivity and speed. This technique is part of the analytical tools that identify foodborne pathogens, being economical, safe, and reliable alternatives for their application in the food industry and control laboratories. The objective was to standardize a multiplex PCR method to simultaneously identify, in the same reaction mixture, the pathogenic bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) in an artificially contaminated cheese matrix subsequently enriched in peptone water. The dilution reported between 10 and 250 CFU was selected to perform the DNA extraction, this being the dilution of 1×10^{-4} . Bands from pure cultures and multiplex PCR were detected by electrophoresis using a UV transilluminator. Standardization of the method for the cheese matrix was performed by inoculating the matrix with the microorganisms of interest, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, and *E. coli*, and the presence of these was then determined by multiplex PCR.

Keywords: mPCR, DNA, cheese, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*

*Cátedra de Microbiología Aplicada, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. **Unidad de Biotecnología, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, 47206, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela. Correspondencia: mariag.cestari@gmail.com

Orcid: [10009-0000-7549-9561](https://orcid.org/0009-0000-7549-9561) [40000-0002-8204-0174](https://orcid.org/0000-0002-8204-0174)

[20009-0002-5124-6919](https://orcid.org/0009-0002-5124-6919) [50000-0002-0055-2804](https://orcid.org/0000-0002-0055-2804)

[30009-0002-1195-5921](https://orcid.org/0009-0002-1195-5921)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.8](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.8)

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

Recepción: 02/11/2024

Aprobación: 02/12/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 209-222. 2024

Introducción

El queso blanco fresco es uno de los quesos de mayor consumo en Venezuela, siendo que más del 50% de los hogares venezolanos consumen el queso duro llanero (Infante, 2020). La mayoría de estos productos se elaboran de forma artesanal, lo que aumenta las posibilidades de contaminación durante su proceso de elaboración, almacenamiento y distribución. La falta de conocimientos básicos sobre la inocuidad por parte de quienes elaboran alimentos se puede considerar como uno de los factores que más contribuyen a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's).

Entre los brotes de origen alimentario que representa un motivo de preocupación, la mayoría proviene de alimentos de origen animal, como carne de res, aves, huevos, leche cruda y productos lácteos, los cuales pueden estar contaminados por múltiples patógenos tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Estos microorganismos se definen como patógenos importantes transmitidos por alimentos debido a la gravedad de las enfermedades y el número de casos que causan (Boukharouba y col., 2022). Los animales destinados a la alimentación son los principales reservorios de muchos patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos, y los productos alimenticios de origen animal son los principales vehículos de transmisión.

Los microorganismos patógenos causan infecciones humanas que se caracterizan principalmente por síntomas gastrointestinales que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, además de otras manifestaciones clínicas como calambres abdominales y otros síntomas específicos

del agente. Algunas bacterias pueden causar complicaciones graves e incluso la muerte (Abebe y col., 2020). Para poder garantizar la seguridad alimentaria y evitar enfermedades transmitidas por estos, es fundamental un proceso de detección rápida y precisa de los diversos agentes patógenos (Fung y col., 2018; Hu, 2019). Más del 90% de las enfermedades por intoxicación alimentaria podrían ser causadas por especies de *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella* spp., *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Vibrio*, *Bacillus* y *E. coli* (Abebe y col., 2020; Bendary y col., 2022; Bintsis, 2017; Chlebicz y Śliżewska, 2018; Fung y col., 2018), mientras que el restante de las ETA's son causadas por los virus de Hepatitis A y Norovirus, y los parásitos *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y *Trichinella spiralis*, entre otros (Bintsis, 2017).

Entre los microorganismos de interés está la *Escherichia coli* O157:H7 ya que constituye un patógeno importante transmitido por los alimentos. *E. coli* O157:H7 se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida y leche cruda. La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados), también es causa de infecciones. Ejemplos de alimentos implicados en brotes de *E. coli* O157:H7 son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado con leche cruda. La mayoría de las infecciones relacionadas con este patógeno se deben al consumo de leche, carne molida, agua y otros productos lácteos contaminados. Se ha determinado

que incluso en dosis bajas de 1 a 100 unidades formadoras de colonias (UFC), puede causar enfermedad (Moezi y col., 2019). La *E. coli* O157:H7, así como las Shiga toxina producida por *E. coli* (STEC) patogénicas distintas a O157:H7 pueden causar complicaciones potencialmente mortales, como diarrea sanguinolenta (colitis hemolítica) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Li y col., 2017).

La leche, el queso, la carne, la nata y los alimentos listos para el consumo son la razón principal de la infección humana por *Listeria monocytogenes*, que afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores y personas con el sistema inmunitario debilitado. La listeriosis es una enfermedad de naturaleza no entérica, que puede llegar al torrente sanguíneo y causar septicemia o al cerebro y causar meningitis o encefalitis (Fox y col., 2021).

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* produce una amplia gama de exotoxinas, incluidas las enterotoxinas resistentes al calor que pueden provocar intoxicación alimentaria. El principal reservorio es el hombre (piel y superficies mucosas) convirtiendo a los manipuladores de alimentos en los mayores agentes transmisores; no obstante, también es vehiculizado por alimentos con alto contenido proteico principalmente carnes, leche y sus derivados (Fetsch, 2018; Yoon y col., 2018; Liu y col., 2021).

Según la Norma COVENIN 3821-2003 para queso blanco, los criterios microbiológicos indican que se debe realizar el análisis de forma recomendada para *E. coli* y de forma obligatoria para *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Recientemente se han desarrollado métodos moleculares que han mostrado ser rápidos, específicos y sensibles para la detección simultánea de diversos patógenos y/o sus toxinas, demostrando que tienen un alto potencial en la investigación de brotes de origen alimentario, el análisis de alimentos y control de alimentos. Entre estos métodos están la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real (qPCR), PCR digital, secuenciación genómica completa (WGS), secuenciación de nueva generación (NGS), la edición genómica CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, por sus siglas en inglés), y microarreglos de ADN, para detectar diversos patógenos causantes de ETAs en una amplia variedad de productos alimenticios (Patel y col., 2016; Hu y col., 2018; Liu, 2021; Shin y col., 2022; Xiong y col., 2022; Boukharouba y col., 2022; Rahman y col., 2022).

La PCR ha revolucionado el análisis microbiológico permitiendo la detección de microorganismos patógenos en alimentos, sin la necesidad del aislamiento e identificación clásicos (Chapela y col., 2015). El método de PCR se puede utilizar para la detección de patógenos moleculares comparando el tamaño del ADN objetivo con marcadores o comparando la secuencia de ADN objetivo con las secuencias contenidas en el banco de genes. La qPCR permite observar cada ciclo de amplificación de ADN con un sistema informático para ver la secuencia del producto de la PCR. La qPCR es reconocida como una técnica altamente específica y sensible que se puede completar en una hora después del proceso de enriquecimiento del microorganismo. Su potencial para la automatización también lo hace adecuado para la detección de un gran número de muestras de alimentos (Lopes y

col., 2019). Los métodos de prueba basados en PCR pueden detectar microorganismos patógenos mediante la identificación de secuencias de ADN diana. El método de la PCR permite detectar diversos microorganismos, incluyendo patógenos humanos viables pero que no son cultivables por los métodos tradicionales (Zhong y Zhao, 2018; Lv y col., 2020; Gao y col., 2021a, b; Ou y col., 2021).

En la actualidad, la PCR y la qPCR son herramientas analíticas esenciales para los investigadores que trabajan en la identificación de los patógenos transmitidos por los alimentos, siendo alternativas económicas, seguras y confiables para su aplicación en la industria alimentaria y los laboratorios de control. Este método tiene la ventaja de su mayor rapidez, menor consumo de muestra, alta selectividad y alta sensibilidad, respecto a los métodos tradicionales de cultivo (Moezi y col., 2019; Stingl y col., 2021). Adicionalmente, la qPCR múltiple permite la detección simultánea de más de un patógeno y sus toxinas en una sola reacción, ahorrando esfuerzo, tiempo y dinero (Chapela y col., 2015).

La PCR múltiple ha ganado gran aceptación y uso debido a su capacidad de diferenciación potencial y confiabilidad entre diversos patógenos y sus toxinas (Rao y Arora, 2020). Esta técnica ha demostrado diversas ventajas para la detección de patógenos causantes de ETA, debido a su bajo costo y la necesidad de un pequeño volumen de muestra para la realización de diversos experimentos en simultáneo (Chen y col., 2021). La mPCR ha sido utilizada para la determinación simultánea de varios genes diana en el esquema de detección de PCR para *E. coli* O157:H7, incluidos los genes de la toxina Shiga (*stx1* y *stx2*) (Anklam y col., 2012; Li y col., 2017; Fung y col., 2018).

Recientemente, fue desarrollado un método de PCR múltiple en tiempo real (mqPCR) para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), después del pre-enriquecimiento de 16h, utilizando sondas TaqMan. Las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis y son oligonucleótidos que contienen una fracción fluorescente donante en el extremo 5' y una fracción fluorescente aceptora en el extremo 3' que apaga la fluorescencia emitida por la molécula donante debido a su proximidad, diseñadas para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa (Liu y col., 2019). Liu y col., 2019 en su estudio lograron una elevada sensibilidad en la detección de los cuatro patógenos en leche contaminada, obteniendo un límite de detección de 1 unidad formadora de colonia (UFC)/25 mL para cada patógeno, y en los ensayos de inclusividad y exclusividad obtuvieron un valor cercano al 100% (Parichehr y col., 2019).

Es por ello, que el presente trabajo pretende diseñar ensayos rápidos, validados y de calidad en el área de microbiología de alimentos, que permitan dar resultados precisos en pocas horas, lo cual representará una gran ventaja económica y la garantía del cumplimiento de la calidad microbiológica a las empresas productoras y agencias regulatorias. La creación de redes de laboratorios de excelencia para el análisis de alimentos a nivel nacional permitirá garantizar un seguimiento continuo de la seguridad alimentaria en nuestro país, lo que podría desempeñar un papel importante en la prevención de riesgos potenciales para la salud de los consumidores, así como de costes económicos innecesarios.

Por lo anterior, se planteó como objetivo estandarizar un método de PCR múltiple para la identificación simultánea de 3 patógenos transmitidos por alimentos de interés para la salud pública en Venezuela: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, de manera rápida y simple.

Para ello, se procedió a 1) Optimizar las condiciones de extracción del material genético de *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*; 2). Determinar la concentración de la suspensión bacteriana de la muestra a utilizar para realizar la extracción de ADN bacteriano; 3) Definir la concentración mínima necesaria del material genético requerido para el método de PCR múltiple para la detección de 3 patógenos transmitidos por alimentos a través de la matriz alimentaria queso blanco fresco: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*; 4) Estimar la sensibilidad y especificidad del método de PCR múltiple utilizando diferentes cepas de referencias; y 5) Realizar la detección simultánea de los 3 patógenos a evaluar en una sola reacción por PCR múltiple.

Metodología

MICROORGANISMOS

Con la finalidad de estandarizar las condiciones de la mPCR se trabajó primeramente con cultivos puros de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, provenientes del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) y del Cepario del Laboratorio de Microbiología de Alimentos, de la Facultad

de Farmacia de la UCV. Los cultivos puros de cada uno de estos microorganismos fueron crecidos en caldo nutritivo (37°C) y caldo nutritivo al 0,6% de extracto de levadura (37°C) para *L. monocytogenes*, para la posterior inoculación de 100µL de cada microorganismo de la muestra de alimento, queso blanco fresco.

Por otra parte, con la finalidad de evaluar la efectividad de la PCR múltiple se aislaron e identificaron los microorganismos patógenos predominantes en la matriz alimentaria de consumo masivo a analizar, como el queso blanco fresco. Las cepas aisladas de la matriz alimentaria en estudio se identificaron a través de la metodología tradicional, mediante recuento en placas con agares específicos para cada microorganismo en estudio: *Escherichia coli*: Agar MacConkey (37°C); *Listeria monocytogenes*: Caldo Nutritivo al 0,6% en Extracto de levadura, Agar Oxford (37°C); y *Staphylococcus aureus*: Agar Baird Parker (37°C) y se utilizaron para experimentos de inoculación posteriores de la misma forma que los cultivos puros.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se prepararon cultivos puros frescos mediante la inoculación por separado de una colonia aislada de cada microorganismo en 100 mL de Caldo Nutritivo, luego se incubaron por 24 horas a 37 °C *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; y 48h a 30 °C *L. monocytogenes*. Para comprobar el crecimiento se comparó la turbidez con una escala de referencia de suspensiones bacteriológicas de McFarland. La concentración requerida para la extracción del ADN y posterior realización de la PCR es de 108 y 109 UFC.

Una vez obtenidos los cultivos puros, se inocularon 100 μ L de cada una de las cepas de los tres microorganismos a estudiar en 25 gramos de una muestra representativa de queso blanco fresco, la cual se dejó en reposo por una hora.

Posteriormente, el tratamiento de la muestra de queso blanco fresco se procedió según lo estipulado en la Norma COVENIN 1126-89, en la cual se establece pesar 25 gramos de muestra en una bolsa de polietileno (previamente identificada) y añadir 225mL de agua peptonada estéril, llevar al Stomacher por 60 segundos para homogeneizar la muestra y dejar en reposo por 1 hora. Esta preparación corresponde a la dilución 1x10⁻¹. Se realizaron las diluciones seriadas correspondientes hasta 1x10⁻⁹ para *E. coli* y *S. aureus*, mientras que para *L. monocytogenes* se realizaron hasta la dilución 1x10⁻⁶. Posteriormente, se realizaron siembras por superficie de cada una de las diluciones en los agares selectivos correspondientes; *Escherichia coli*: Agar MacConkey (37°C); *Listeria monocytogenes*: caldo nutritivo al 0,6% de extracto de levadura, Agar Oxford (37°C); y *Staphylococcus aureus*: Agar Baird Parker (3 °C). La siembra en cada agar selectivo fue de 0,1mL de cada dilución.

EXTRACCIÓN DE ADN

Las extracciones de ADN de los cultivos puros de bacterias patógenas y de la muestra de queso, se realizaron con un Kit gBAC Mini ADN Bacteria (IBI Scientific, Iowa, Estados Unidos), de acuerdo con los protocolos del fabricante.

En el caso de la muestra, se seleccionó la dilución 1x10⁻⁴ se corresponde con una concentración entre 108 y 109 UFC, de

acuerdo con los requerimientos del kit. La calidad del ADN se evaluó midiendo la tasa de A260/A280 en un espectrofotómetro ultravioleta Beckman Coulter™ DU® 530 *Life Science UV/Vis Spectrophotometer* (California, USA) y se detectó la integridad con electroforesis en geles de agarosa al 2%. El ADN genómico (ADNg) de las cepas evaluadas se almacenaron en congelador hasta su análisis mediante mPCR.

PRIMERS

La mPCR se llevó a cabo con la combinación de 3 pares de cebadores específicos en una reacción (Tabla I). Para la detección de los patógenos se usaron los cebadores dirigidos a los genes: *E. coli* GADA 670-F/R dirigido al gen que codifica la enzima glutamato descarboxilasa (*gadA*), los cebadores Nuc 484-F/R, dirigido al gen codificante de la nucleasa termoestable (*nuc*) de *S. aureus* y cebadores LM 404-F/R dirigido al gen de la listeriolisina (*lisA*) para la detección de *L. monocytogenes*. Las especificidades de los cebadores se analizaron a través de: Primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para evitar la aparición de productos no específicos o formación de dímeros de primer. Las secuencias de los cebadores empleados para la detección de los tres (3) organismos patógenos se muestran en la Tabla I. Todos los cebadores fueron adquiridos de Alfa Quantum C.A., los cuales fueron sintetizados por Macrogen (Caracas, Venezuela).

Sistema de Reacción y Condiciones

PCR SIMPLE

La validación de los cebadores se realizó de manera individual por PCR simple, se

Tabla I.
Cebadores para utilizar para la detección de los 3 patógenos de interés

Cepa	Gen	Secuencias 5'	3'	Longitud	Referencia
<i>E. coli</i>	GADA/F	ACCTGCGTTGCGTAAATA		670 pb	McDaniels y col., 1996
	GADA/R	GGGCGGGAGAAGTTGATG			
<i>S. aureus</i>	Nuc/F	CTTAGCCAAGCCTTGACGAAC		484 pb	Xu y col., 2006
	Nuc/R	AAAGGGCAATACGCAAAGAGGT			
<i>L. monocytogenes</i>	LM404/F	ATCATCGACGGCAACCTCGGAGAC		404 pb	Wu y col., 2004
	LM404/R	CACCATTCCAAGCTAAACCAGTGC			

preparó una mezcla de reacción para cada patógeno de manera independiente que contenía 25 μL de EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix (LUCIGEN), 0,5 μL de los cebadores, para un volumen final de 50 μL . Se utilizó para el control negativo de la PCR, agua libre de ADN en lugar de la muestra del ADN de los patógenos. Las condiciones de amplificación fueron las mismas para cada patógeno, la cual correspondió a desnaturalización inicial 94°C por 2 min, entre 30 y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, variando las temperaturas de hibridación entre 58°C y 60°C por 30 segundos, extensión 72°C por 1 minuto y una extensión final de 7 minutos a 72°C. La amplificación se realizó en el termociclador (*Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China*).

Después de la amplificación se tomó el ADN amplificado y se mezcló en una proporción 1:1 con buffer de carga, se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando SYBR Safe DNA Stain (BioLund Scientific LLC) como marcador fluorescente para evidenciar las bandas mediante un transiluminador UV (Transilluminator Model M-20 95-0216-01, Upland, C.A 91786, USA).

PCR MULTIPLEX

La PCR multiplex (mPCR) fue desarrollada para la detección simultánea de los 3 patógenos en una sola reacción. Las condiciones de la mezcla de reacción y amplificación fueron realizadas como fue descrito por Boukharouba y col., 2022. Se realizó una mezcla de reacción para un volumen final de 50 μL , que contenía 25 μL de EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix, la concentración de los cebadores era: GADA670 0,5 μL de cada cebador, Nuc484 0,5 μL de cada cebador, LM404 0,5 μL de cada cebador; 10 ng de ADN extraído y Agua Libre de Nucleasa. Para el control negativo de la reacción se utilizó Agua Libre de Nucleasa. La amplificación por PCR se realizó manteniendo las mismas condiciones especificadas en la PCR simple. Una vez completada la reacción, todos los productos de amplificación de PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando SYBR Safe DNA Stain, y se visualizó bajo un transiluminador (Transilluminator Model M-20 95-0216-01, Upland, C.A 91786, USA).

ESPECIFICIDAD DE LA mPCR

Para evaluar la especificidad de la mPCR se confirmó la selectividad de cada cebador mezclando los 3 pares de cebadores con varias combinaciones aleatorias de ADN de control positivo y luego amplificando con las condiciones estandarizadas de la mPCR. El ADN extraído de cultivos puros de los 3 patógenos estudiados se emplearon como control positivo.

Luego se tomaron otras cepas disponibles de aislamientos del laboratorio de la cátedra de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Farmacia UCV y las suministradas por el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, para la evaluación de la especificidad.

SENSIBILIDAD DE LA mPCR

La sensibilidad se evaluó, en primer lugar, utilizando el ADN extraído por separado de los 3 cultivos puros en caldo nutritivo, para determinar los límites de detección de cada PCR simple y mPCR. Posteriormente, se realizaron pruebas utilizando ADN extraído de co-cultivos realizados en agua peptonada con y sin matriz alimenticia inoculada artificialmente.

Resultados

SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Luego de realizarse las siembras de los agares selectivos de la muestra de queso blanco fresco, se procedió a seleccionar la dilución que reportó entre 10 y 250 UFC, siendo esta la dilución 1×10^{-4} , la cual

reportó un contaje promedio de 214 UFC para *S. aureus* en Agar Baird-Parker, para *E. coli* se obtuvo un promedio de 10 UFC en el Agar MacConkey y 12 UFC para *L. monocytogenes* en Agar Oxford Modificado (Figuras 1 y 2).

CUANTIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO EXTRAÍDO

Se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría UV a longitudes de onda de 260nm y 280nm de varios ADN genómicos extraídos con el kit, y se seleccionaron para la PCR aquellas muestras que reportaron una tasa superior a 1,7 y concentraciones para cumplir con los requerimientos del kit de la master mix para PCR (10ng/ μ L de ADN).

Los resultados mostraron la detección de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* y que la intensidad de las bandas disminuye a medida que disminuyen las concentraciones de ADN colocadas en cada carril (Figuras 3A y 3B).

ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES POR EL ADN BACTERIANO

Para determinar los límites de detección de cada PCR simple en condiciones optimizadas se realizaron varias electroforesis en gel de agarosa al 2%, siguiendo un gradiente decreciente del ADN utilizado en las reacciones. Las cantidades de ADN utilizadas en cada mezcla se calcularon experimentalmente a partir de la concentración mínima de ADN requerido para el método de mPCR.

En cuanto a la especificidad, se realizaron diversas electroforesis utilizando variedad



Figura 1. Recuento en placas de las diluciones seriadas de la muestra de queso blanco fresco para *S. aureus* en Agar Baird Parker y *E. coli* en Agar MacConkey. De izquierda a derecha desde la dilución 1×10^{-1} hasta la 1×10^{-9} , por duplicado

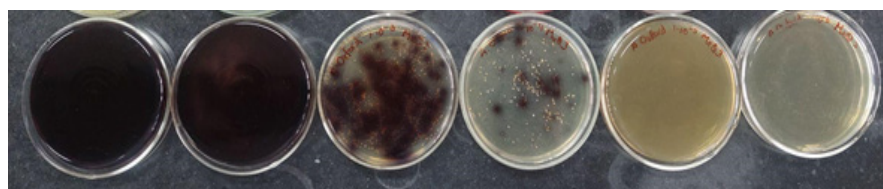


Figura 2. Recuento en placa de las diluciones seriadas de la muestra de queso blanco fresco en Agar Oxford para *L. monocytogenes*. De izquierda a derecha desde la dilución 1×10^{-1} hasta la 1×10^{-6}

de cepas de referencia obtenidas del Cepario de la Cátedra de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Farmacia de la UCV y del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Figura 4).

En la corrida electroforética de la Figura 5 se pudo observar que la PCR amplificó para las bandas correspondientes a 404pb para *L. monocytogenes*, 484pb para *S. aureus* y 670 pb para *E. coli*, por lo que se evidencia que en el pool de cepas puras control, se logran observar las tres bandas pertenecientes a cada microorganismo estudiado, confirmando que los cebadores reconocen el material genético específico para cada uno.

En la corrida electroforética de la Figura 6 de la muestra de queso y controles, se

logró observar las bandas correspondientes a 404pb para *L. monocytogenes* y 484pb para *S. aureus*, más no se evidencia la banda perteneciente a 670 pb para *E. coli*.

PCR Simple y PCR Multiplex

PCR SIMPLE

En primer lugar, se aplicó la detección por PCR simple de cultivos puros individuales para verificar el correcto rendimiento de cada par de cebadores y el rendimiento del método de extracción de ADN. Los resultados demostraron que la amplificación específica de *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* produjo amplicones de diferentes tamaños, correspondientes a 670 pb, 484 pb y 404 pb, respectivamente, que aparecen como

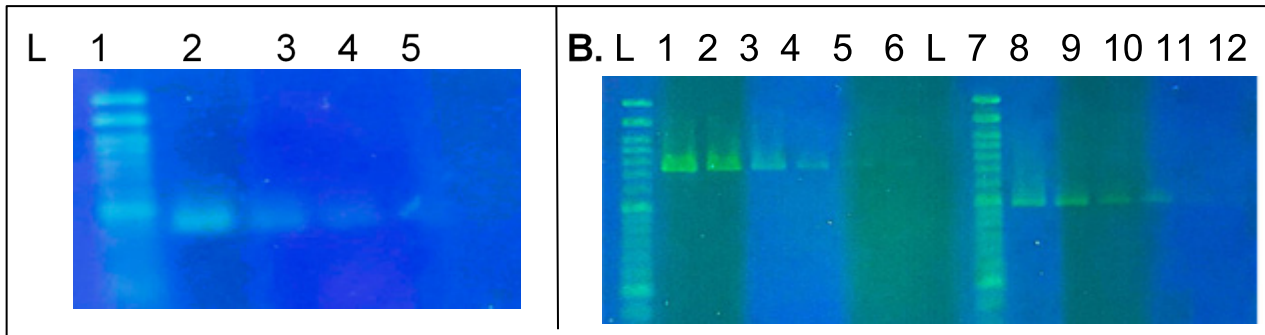


Figura 3. A. Detección de la sensibilidad de los primers para *Listeria monocytogenes* amplificada LM 404 bp, marcador de 50pb., banda 1 al 5 de la concentración 9,86 ng/μL hasta 1,95 ng/μL. **B.** Detección de la sensibilidad de los primers para *Escherichia coli*, GADA 670 bp y *Staphylococcus aureus* Nuc 484 bp. L, marcador de 50pb., banda 1 a la 6, de la concentración 28,2 ng/μL hasta 3,71 ng/μL; banda de 7 a la 12, de la concentración 5,27 ng/μL hasta 0,69 ng/μL

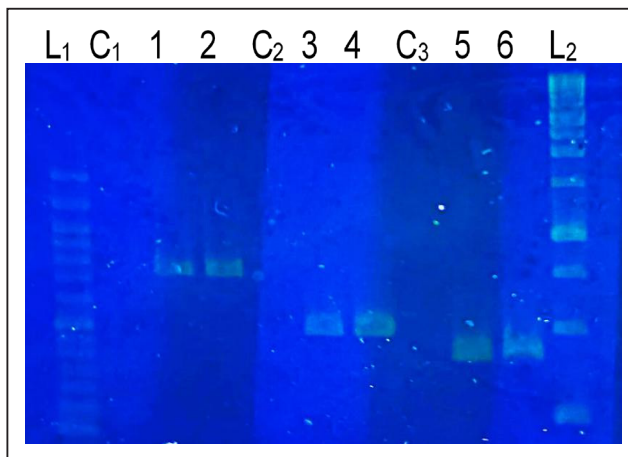


Figura 4. Determinación de la especificidad de los cebadores de *E. coli* GADA 670pb, *S. aureus* Nuc 484pb y de *L. monocytogenes* LM 404 pb, por las cepas puras individuales. L₁, marcador de 50pb, C₁, control negativo de *E. coli*, 1 y 2, cepa pura de *E. coli* amplificada; C₂, control negativo de *S. aureus*, 3 y 4, cepa pura de *S. aureus* amplificada; C₃, control negativo de *L. monocytogenes*, 5 y 6 cepa pura de *L. monocytogenes* amplificada, L₂, marcador de 1kp

bandas distintas en el gel de electroforesis, sin ningún producto no específico. En la Figura 4 se observa dicho rendimiento.

mPCR

Después de validar los cebadores mediante PCR simple, se realizó la multiplexación llevando a cabo mediante una integración progresiva de cebadores

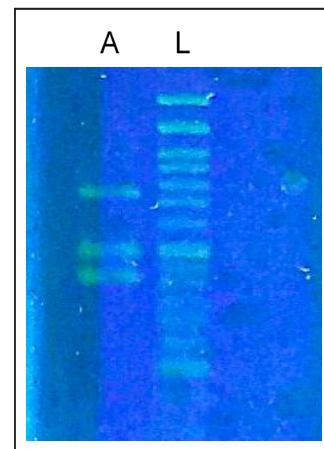


Figura 5. Determinación de la especificidad de los cebadores de *L. monocytogenes* LM404 a 404bp, *S. aureus* Nuc 484 bp y *E. coli* GADA 670 bp en un pool de microorganismos. A, pool de las cepas puras en estudio, *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*; L, marcador de 50pb

que se mezclaron en una sola reacción con sus respectivos ADN diana (PCR multiplex). Para asegurar la amplificación de los tres fragmentos objetivo y para evitar reacciones no específicas, la temperatura de hibridación se optimizó en el equilibrio de concentración de los tres pares de cebadores en la reacción.

En la detección por mPCR de los microorganismos patógenos a partir del pool de cepas puras se observaron las tres bandas correspondientes a *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*. Dicha detección obedece a la Figura 5.

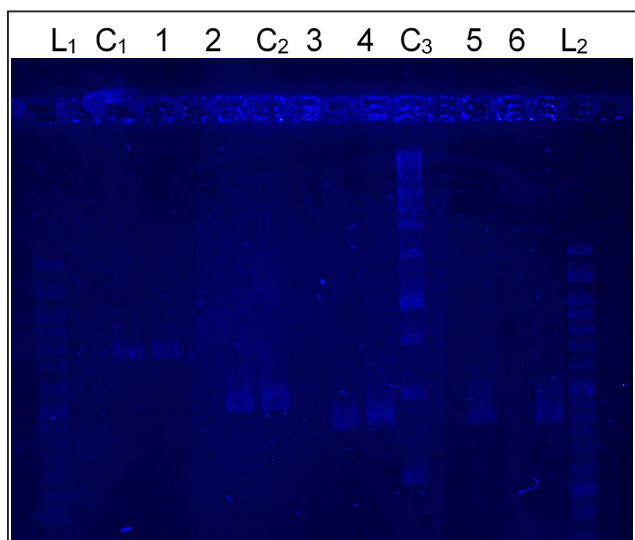


Figura 6. Determinación de la especificidad de los cebadores de *L. monocytogenes* LM404 a 404bp, *S. aureus* Nuc 484 bp y *E. coli* GADA 670 bp en una muestra de queso blanco fresco en comparación con las cepas puras individuales de los microorganismos. L₁, marcador de 50pb, C₁, control negativo de *E. coli*, 1 y 2, cepa pura de *E. coli* amplificada; C₂, control negativo de *S. aureus*, 3 y 4, cepa pura de *S. aureus* amplificada; C₃, control negativo de *L. monocytogenes*, 5 y 6 cepa pura de *L. monocytogenes* amplificada, L₂, marcador de 1kp; C₄, control negativo de muestra A; A, muestra de queso con ADN amplificado; C₅, control negativo de muestra B; B, muestra de queso con ADN amplificado

En la corrida electroforética de la muestra de queso blanco fresco (Figura 7) se observaron correctamente las bandas de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, sin evidencia de la banda correspondiente a *E. coli* (duplex PCR).

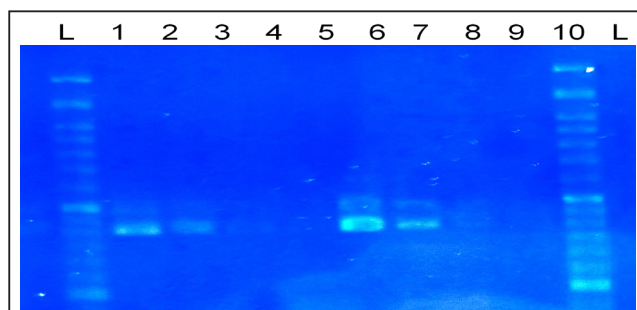


Figura 7. Detección de microorganismos patógenos *L. monocytogenes* (cebador LM404 a 404bp) y *S. aureus* (cebador Nuc 484 bp) en la muestra de queso blanco fresco inoculada. L, marcador 50pb; bandas de 1 a 5 correspondientes a la muestra A de queso blanco; bandas de 6 a 10 correspondientes a muestra B de queso blanco: L, marcador de 50pb

Discusion y Conclusiones

La utilización del método de PCR permite obtener resultados más rápidos, dado que el método tradicional de recuento en placas, que requiere de la confirmación de los resultados mediante pruebas bioquímicas, alarga el tiempo para la identificación y reporte de los microorganismos de interés (Aladhadh, 2023).

La estandarización del método para la matriz de queso se realizó inoculando la matriz con los microorganismos de interés, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, y la presencia de éstos se determinó luego a través de la PCR múltiple.

Los primeros resultados están relacionados a la detección del número de UFC de cada microorganismo, que se determinó mediante una dilución seriada 1:10 en caldo nutritivo, seguida de la siembra de 0,1 mL de cada dilución para obtener un recuento de colonias viables mediante el método de siembra por superficie en placas de agar selectivo. Las colonias se contaron después de una incubación nocturna a 37°C. A partir de aquí se determinó la concentración a utilizar para realizar la extracción del ADN de las muestras.

Otros investigadores también han estandarizado la detección de patógenos en alimentos por mPCR utilizando el ADN extraído de alícuotas de recuperación de co-cultivo de matrices alimentarias inoculadas artificialmente. Boukharouba y col., reportaron en el año 2022 la recuperación de 4 patógenos *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Salmonella enterica* (*S. enterica*) en hojas de lechuga y carne picada,

de acuerdo con las condiciones optimizadas mencionadas anteriormente. Por su parte, Chen y col., en 2022, reportaron que los límites de detección de *Salmonella*, *E. coli* y *S. aureus* en medio puro fueron de 100, 100 y 10 UFC/mL, respectivamente, lo que permite utilizar este método en el monitoreo de la contaminación microbiana en medicamentos y alimentos.

Con respecto a la estandarización de las condiciones de reacción de la PCR múltiple, luego de evaluar varias condiciones, se determinó que la temperatura de hibridación óptima para la combinación de primers utilizada es de 59°C, con lo cual se pudo observar las bandas de los microorganismos de interés.

Como ha sido descrito por Li y col., en 2022, la disminución en la especificidad de amplificación puede deberse a una baja temperatura de hibridación, por el contrario, en una PCR múltiple, un incremento en la temperatura de annealing (temperatura de hibridación), pudiera evitar que se observen algunas bandas. La temperatura de alineamiento es la temperatura a la cual los primers se unen con el ADN plantilla. La temperatura de alineamiento es la temperatura a la cual el primer se hibridiza al ADN template. Li y col. (2017), luego de probar temperaturas de hibridación desde 48 hasta 68°C, sugieren que el brillo de las bandas observadas en la PCR múltiple depende de la temperatura de hibridación. Li y col. (2017), en un estudio de PCR multiplex para la determinación de los microorganismos *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *C. sakazakii*, *S. flexneri*, *P. putida*, *V. vulnificus*, and *V. alginolyticus*, reportaron que mejoraron el brillo de las bandas modificando las concentraciones de los primers.

En el presente trabajo, la eficiencia de amplificación para la detección de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y de *S. aureus*, se mejoró ajustando la concentración de los cebadores, quedando 1 μ M para *E. coli*, 0,5 μ M para *S. aureus* y 0,25 μ M para *Listeria monocytogenes*, con el fin de equilibrar eficazmente la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores y el brillo de las bandas.

Recomendaciones

Se recomienda continuar con la estandarización del PCR multiple que permita la detección simultánea de los patógenos *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* en queso blanco fresco. Se sugiere incluir más patógenos (Tao y col., 2020) para detectar en una misma mezcla de reacción, lo cual permitirá prevenir enfermedades transmitidas por alimentos y proteger la salud de la población de manera más eficiente.

Referencias Bibliográficas

- Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. 2020. Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *J Trop Med* 2020:4674235.
- Aladhadh M. 2023. A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms* 11(5):1111.
- Anklam KS, Kanankege KS, Gonzales TK, Kaspar CW, Döpfer D. 2012. Rapid and reliable detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time multiplex PCR. *J Food Prot* 75(4):643-650.
- Bendary MM, Abd El-Hamid MI, El-Tarabili RM, Hefny AA, Algendy RM, Elzohairy NA, Ghoneim MM, Al-Sanea MM, Nahari MH, Moustafa WH. 2022. *Clostridium perfringens* Associated with Foodborne Infections of Animal Origins: Insights into Prevalence, Antimicrobial Resistance, Toxin Genes Profiles, and Toxinotypes. *Biology (Basel)* 11(4):551.

- Bintsis T. 2017. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol* 3(3):529-563.
- Boukharouba A, González A, García-Ferrús M, Ferrús MA, Botella S. 2022. Simultaneous Detection of Four Main Foodborne Pathogens in Ready-to-Eat Food by Using a Simple and Rapid Multiplex PCR (mPCR) Assay. *Int J Environ Res Public Health* 19(3):1031.
- Chapela MJ, Garrido-Maestu A, Cabado AG. 2015. Detection of foodborne pathogens by qPCR: A practical approach for food industry applications, *Cogent Food & Agriculture* 1:1,
- Chen Y, Wang Z, Shi Q, Huang S, Yu T, Zhang L, Yang H. 2021. Multiplex PCR method for simultaneous detection of five pathogenic bacteria closely related to foodborne diseases. *3 Biotech* 11(5):219.
- Chen M, Lan X, Zhu L, Ru P, Xu W, Liu H. 2022. PCR Mediated Nucleic Acid Molecular Recognition Technology for Detection of Viable and Dead Foodborne Pathogens. *Foods (Basel, Switzerland)* 11(17): 2675.
- Chlebicz A, Śliżewska K. 2018. *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review*. *Int J Environ Res Public Health* 15(5):863.
- Comisión Venezolana De Normas Industriales (COVENIN) 3821-2003. Queso blanco. Fondonorma. Caracas, Venezuela. 8 p.
- Comisión Venezolana De Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 1126-89. Alimentos. Identificación y preparación de muestra para análisis microbiológico. 1a Rev. 7 pp. 198.
- Fetsch A. 2018. *Staphylococcus aureus*. London: Academic Press.
- Fox EM, Bierne H, Stessl B. 2021. *Listeria monocytogenes*. Methods and Protocols. New York: Humana Press.
- Fung F, Wang HS, Menon S. 2018. Food safety in the 21st century. *Biomed J* 41(2):88-95.
- Gao S, Liu J, Li Z, Ma Y, Wang J. 2021a. Sensitive detection of foodborne pathogens based on CRISPR-Cas13a. *J Food Sci* 86(6):2615-2625.
- Gao R, Liao X, Zhao X, Liu D, Ding T. 2021b. The diagnostic tools for viable but nonculturable pathogens in the food industry: Current status and future prospects. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20(2):2146-2175.
- Hu L. 2019. Food Safety Rapid Detection and Effective Prevention of Foodborne Hazards. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hu L, Deng X, Brown EW, Hammack TS, Ma LM, Zhang G. 2018. Evaluation of Roka Atlas *Salmonella* method for the detection of *Salmonella* in egg products in comparison with culture method, real-time PCR and isothermal amplification assays. *Food Control* 94:123-131.
- Infante G. 2020. Invelear: «El 50% de los hogares venezolanos consume queso blanco duro llanero». Fedecamaras Radio. Retrieved March 20th, 2024, from: <https://fedecamarasradio.com/queso-blanco-esta-en-el-50-de-los-hogares-venezolanos/>
- Li B, Liu H, Wang W. 2017. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. *BMC Microbiol* 17(1):215.
- Li P, Feng X, Chen B, Wang X, Liang Z, Wang L. 2022. The Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria in Seafood Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction System. *Foods* 11(23):3909.
- Liu Y, Cao Y, Wang T, Dong Q, Li J, Niu C. 2019. Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Front Microbiol* 10:222.
- Liu S, Wang B, Sui Z, Wang Z, Li L, Zhen X, Zhao W, Zhou G. 2021. Faster Detection of *Staphylococcus aureus* in Milk and Milk Powder by Flow Cytometry. *Foodborne Pathog Dis* 18(5):346-353.
- Lopes ATS, Maciel BM. 2019. Real-Time Quantitative PCR as a Tool for Monitoring Microbiological Quality of Food. In: Nagpal ML, Boldura O, Baltă C, Enany S, editors. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science (Internet)*. London: IntechOpen.
- Lv R, Wang K, Feng J, Heeney DD, Liu D, Lu X. 2020. Detection and Quantification of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Front Microbiol* 10:2920.
- Moezi P, Kargar M, Doosti A, Khoshneviszadeh M. 2019. Multiplex touchdown PCR assay to enhance specificity and sensitivity for concurrent detection of four foodborne pathogens in raw milk. *J Appl Microbiol* 127(1):262-273.
- Ou A, Wang K, Ye Y, Chen L, Gong X, Qian L, Liu J. 2021. Direct Detection of Viable but Non-culturable (VBNC) *Salmonella* in Real Food System by a Rapid and Accurate PMA-CPA Technique. *Front Microbiol* 12:634555.
- Parichehr M, Mohammad K, Abbas D, Mehdi K. 2019. Developing a multiplex real-time PCR with a new

- pre-enrichment to simultaneously detect four foodborne bacteria in milk. *Future Microbiol* 14:885-898.
- Patel IR, Gangiredla J, Lacher DW, Mammel MK, Jackson SA, Lampel KA, Elkins CA. 2016. FDA *Escherichia coli* Identification (FDA-ECID) microarray: a pangenome molecular toolbox for serotyping, virulence profiling, molecular epidemiology, and phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 82(11):3384-3394.
- Rahman MM, Lim SJ, Park YC. 2022. Development of Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Based Triplex PCR Marker for Serotype-specific *Escherichia coli* Detection. *Pathogens* 11(2):115.
- Rao S, Arora K. 2020. Recent trends in molecular techniques for food pathogen detection, In: *Chemical Analysis of Food (Second Edition)*, Editor(s): Yolanda Pico, Academic Press, 177-285.
- Shin J, Miller M, Wang YC. 2022. Recent advances in CRISPR-based systems for the detection of foodborne pathogens. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 21(3):3010-3029.
- Stingl K, Heise J, Thieck M, Wulsten IF, Pacholewicz E, Iwobi AN, Govindaswamy J, Zeller-Péronnet V, Scheuring S, Luu HQ, Fridriksdottir V, Gözl G, Priller F, Gruntar I, Jorgensen F, Koene M, Kovac J, Lick S, Réperant E, Rohlfing A, Zawilak-Pawlik A, Rossow M, Schlierf A, Frost K, Simon K, Uhlig S, Huber I. 2021. Challenging the “gold standard” of colony-forming units - Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses. *Int J Food Microbiol* 359:109417.
- Tao J, Liu W, Ding W, Han R, Shen Q, Xia Y, Zhang Y, Sun W. 2020. A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens. *J Food Sci* 85(3):744-754.
- Xiong D, Zhou Y, Song L, Liu B, Matchawe C, Chen X, Pelle R, Jiao X, Pan Z. 2022. Development of a Duplex TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction for Accurate Identification and Quantification of *Salmonella* Enteritidis from Laboratory Samples and Contaminated Chicken Eggs. *Foods* 11(5):742.
- Yoon J-H, Wei S, Oh D-H. 2018. A highly selective enrichment broth combined with real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples. *LWT-Food Sci Technol* 94:103-110.
- Zhong J, Zhao X. 2018. Detection of viable but non-culturable *Escherichia coli* O157:H7 by PCR in combination with propidium monoazide. *3 Biotech* 8(1):28.



Síntesis y Caracterización de un Nanocompuesto de Cobre-Quitósano/Ácido Hialurónico y su Actividad Antimicrobiana

Synthesis and Characterization of a Copper-Chitosan/Hyaluronic Acid Nanocomposite and its Antimicrobial Activity

JOSÉ D. TOVAR^{*,1}, MARÍA RODRÍGUEZ^{*,2}, JACOBUS DE WAARD^{**,3}, FRANKLIN CLARO^{**,4}

Resumen

Se preparó un nanocompuesto con actividad bactericida a partir de nanopartículas de cobre en una matriz de complejos de polielectrolitos (PEC) de quitosano y ácido hialurónico. Las nanopartículas, los PEC y el nanocompuesto fueron caracterizados empleando técnicas de UV-Vis, IR, AFM, DLS y microscopía óptica. La actividad antimicrobiana del compuesto fue ensayada frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium abscessus* tipo II, en condiciones limpias y sucias mediante una modificación de la prueba cuantitativa en suspensión de acuerdo con la norma europea EN 1276. Se encontró que la matriz de PEC permite la estabilización de las nanopartículas de cobre, evitando su aglomeración en el tiempo. Por otro lado, el ensayo de actividad antimicrobiana permitió determinar que el nanocompuesto es efectivo sobre *P. aeruginosa* con reducción de viabilidad de 7-Log₁₀ en 5 minutos en condiciones limpias y sucias; sobre *S. aureus* con reducción de 3,85-Log₁₀ en 120 minutos en condiciones limpias y 6-Log₁₀ en 5 minutos en condiciones sucias y sobre *M. abscessus* con una reducción de 7-Log₁₀ en 120 minutos en condiciones limpias y 2,34-Log₁₀ en 120 minutos en condiciones sucias. Este estudio es un aporte hacia el entendimiento y mejoramiento del diseño de nanocompuestos con potencial actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Nanopartículas metálicas, complejos de polielectrolitos, nanocompuesto, antimicrobiano

Abstract

A nanocomposite with bactericidal activity was prepared from copper nanoparticles in a matrix of polyelectrolyte complexes (PEC) of chitosan and hyaluronic acid. The nanoparticles, PECs, and nanocomposite were characterized using UV-Vis, IR, AFM, DLS, and optical microscopy techniques. The antimicrobial activity of the composite was assayed against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Mycobacterium abscessus* type II under clean and dirty conditions by a modification of the quantitative suspension test according to the European Standard EN 1276. It was found that the PEC matrix stabilizes copper nanoparticles, avoiding their agglomeration over time. On the other hand, the antimicrobial activity test showed that the nanocomposite is effective on *P. aeruginosa* with a viability reduction of 7-Log₁₀ in 5 minutes in clean and dirty conditions; on *S. aureus* with a decrease of 3.85-Log₁₀ in 120 minutes in clean conditions and 6-Log₁₀ in 5 minutes in dirty conditions and *M. abscessus* with a reduction of 7-Log₁₀ in 120 minutes in clean conditions and 2.34-Log₁₀ in 120 minutes in dirty conditions. This study contributes to understanding and improving the design of nanocomposites with potential antimicrobial activity.

Keywords: Metallic nanoparticles, polyelectrolyte complexes, nanocomposite, antimicrobial

* Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ** Laboratorio de Tuberculosis, Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: jdtovarb07@gmail.com

Orcid: [10009-0003-1747-7526](https://orcid.org/0009-0003-1747-7526)

[20000-0002-7242-1109](https://orcid.org/0000-0002-7242-1109)

[30000-0003-4118-1015](https://orcid.org/0000-0003-4118-1015)

[40000-0003-0937-7616](https://orcid.org/0000-0003-0937-7616)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.9](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.9)

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

Recepción: 02/07/2024

Aprobación: 14/09/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 223-235. 2024

Introducción

La nanotecnología se basa en la manipulación de la materia a una escala casi atómica y molecular para producir materiales con características fisicoquímicas mejoradas. Esta tecnología promete avances científicos en muchos sectores (Adams y Barbante, 2013). Muchos aspectos de la nanotecnología se basan en el hecho que las propiedades de los materiales cambian cuando alcanzan la escala nanométrica. A medida que disminuyen las escalas de longitud de los materiales (por debajo de los 100 nm), los efectos producto del incremento del área superficial se vuelven importantes y aparecen efectos cuánticos que conducen a cambios profundos en las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales (Adams y Barbante, 2013; Gómez Garzón, 2018).

Entre los nanomateriales más representativos se encuentran las nanopartículas (Nps), que son estructuras con tamaños en el rango de entre 1 y 100 nm, generalmente clasificadas de acuerdo con su material de composición en orgánicas, inorgánicas o a base de carbono. Las Nps exhiben propiedades físicas, químicas y biológicas únicas en comparación con las propiedades de los materiales de las que están compuestas a escala microscópica (Ealias y Saravanakumar, 2017).

En las últimas décadas, las Nps metálicas (MNps) han sido ampliamente utilizadas en diversas industrias debido a su amplia gama de propiedades eléctricas, físicas, químicas y ópticas (Khodashenas y Ghorbani, 2014). Entre los metales, el cobre (Cu) es de particular interés ya que los iones de cobre, solos o en complejos de cobre, se han utilizado durante siglos para desinfectar líquidos, sólidos y tejidos

humanos. Hoy en día, el cobre se utiliza como purificador de agua, alguicida, fungicida, nematocida, molusquicida y agente antibacteriano y antiincrustante (Borlow y Gabbay, 2004).

Más recientemente se ha determinado que la supervivencia del virus SARS-CoV-2 disminuye en superficies de cobre en comparación con superficies de cartón, acero inoxidable y plástico (van Doremalen y col., 2020). Se ha considerado que el efecto del cobre depende del tiempo y la concentración, lo que da como resultado un daño irreversible al virus y la destrucción de las paredes celulares (Warnes y col., 2015).

En vista de la gran variedad de aplicaciones del cobre, la síntesis de nanopartículas de cobre (CuNps) es muy apreciada. Generalmente, las MNps se sintetizan a través de tres tipos diferentes de métodos: químicos, físicos y biológicos. Sin embargo, solo algunos de los métodos de síntesis reportados son capaces de producir CuNps estables, debido a la alta tasa de oxidación de las CuNps (Borlow y Gabbay, 2004; Khodashenas y Ghorbani, 2014).

La estabilización de MNps puede alcanzarse a través de dos métodos: estabilización estérica o estabilización electrostática (Schmid, 1994). Una estabilización combinada de tipo electrostática puede lograrse a través del empleo de un tipo de nanoestructura que ha ganado popularidad recientemente, los complejos de polielectrolitos. Los complejos de polielectrolitos (PEC) se forman espontáneamente cuando dos polielectrolitos (PEL) con cargas opuestas interactúan a través de atracciones electrostáticas al mezclarse en una solución acuosa (Yang y col., 2015).

El autoensamblaje de los PEC es un proceso reversible donde los complejos coexisten en equilibrio con los PEL libres en solución. Esta naturaleza dinámica de los PEC inevitablemente compromete su integridad por la dilución o adición de otras especies cargadas. Como resultado, la estabilidad de los PEC puede verse seriamente comprometida en entornos biológicos, donde se pueden encontrar elevadas concentraciones de pequeños electrolitos y proteínas cargadas (IWu y Delair, 2015; Insua y col., 2016).

Para solventar este problema, los PEC se pueden estabilizar fácilmente mediante el entrecruzamiento iónico de los componentes del PEC, minimizando de esta manera el intercambio con los polímeros libres en solución. En relación con esto último, se sabe que las propiedades de unión de los PEL a otras especies cargadas muestran una fuerte dependencia de la densidad de carga y el número de grupos cargados en la estructura del PEL. Como resultado de la naturaleza cooperativa de la unión de los PEL, los polímeros con densidades de carga más elevadas muestran una mayor afinidad por los sustratos cargados (Insua y col., 2016). La forma más sencilla de aumentar la densidad de carga es aumentar el peso molecular del PEL, y una manera de lograr este fin es reticulando o entrecruzando los polímeros en el PEC, aumentando así drásticamente el peso molecular general del polímero y, en consecuencia, su afinidad de unión (Insua y col., 2016).

La formación de los PEC pasa por la escogencia de dos polielectrolitos de carga opuesta. Son de interés el quitosano (poliación) y ácido hialurónico (polianión), por su biocompatibilidad y porque se ha encontrado que los PEC formados a partir

de estos biopolímeros poseen propiedades de liberación controlada de fármacos y protección de la carga útil encapsulada contra la degradación química (Yang y col., 2015), además del hecho que estos biopolímeros, especialmente el quitosano, pueden actuar como estabilizadores de MNps, previniendo su aglomeración y oxidación.

La nanotecnología y la creación de nuevos materiales con propiedades antimicrobianas potenciadas reciben cada vez más atención en vista de la creciente preocupación por la resistencia antimicrobiana como uno de los tres problemas más importantes de salud pública del siglo XXI (*World Health Organization*, 2014). En este contexto, y de acuerdo con lo expuesto anteriormente, se propuso formular nanocompuestos de CuNps en matrices de PEC de quitosano/ácido hialurónico, que puedan incrementar sus propiedades fisicoquímicas y antibacterianas, manteniendo la biocompatibilidad del biopolímero y reduciendo la posible toxicidad de las Nps. Esto con el fin de obtener un nanocompuesto con potencial actividad antibacteriana y con aplicación en el área biomédica.

Materiales y Métodos

NANOPARTÍCULAS DE COBRE

La metodología se basó en la aplicada por Phul y col. (2018) para la obtención de CuNps.

COMPLEJOS DE POLIELECTROLITOS

Se prepararon volúmenes iguales de soluciones de quitosano (Q) en ácido láctico (AL) y ácido hialurónico (AH) en agua. En

agitación vigorosa, se adicionó gota a gota la solución de ácido hialurónico sobre la de quitosano, a temperatura ambiente. La aparición de opalescencia evidenció la formación de una suspensión de los PEC. Adicionalmente se estudió el efecto que tiene la adición de tripolifosfato (TPP) en un rango de valores entre 0,1 y 0,001% m/v en la estabilidad de las suspensiones de PEC.

NANOCOMPUESTO DE CuNPS-PEC

La obtención del nanocompuesto se realizó por la adición del sólido de CuNps a la suspensión de PEC previamente preparada, en agitación vigorosa, para asegurar la formación de una suspensión uniforme. La suspensión opalescente de PEC pasó de una coloración blanca lechosa a una rosa por la presencia de las CuNPs.

Se siguieron las siguientes metodologías para la caracterización de las CuNps y del nanocompuesto:

1. Estudio cualitativo de propiedades ópticas

Se estudió de manera cualitativa el comportamiento óptico de una suspensión de CuNps empleando un espectrofotómetro de UV-Visible modelo Nicolet Evolution 300, marca Thermo Electron Corporation. El medio dispersivo fue agua destilada.

2. Estimación del radio hidrodinámico

Se evaluó el diámetro hidrodinámico de las suspensiones de CuNps y PEC empleando un montaje experimental para Dispersión Dinámica de Luz. El montaje hizo uso de un láser de longitud de onda (λ) 635 nm con un ángulo de dispersión de 90°. Para las CuNps, el medio dispersivo fue

agua destilada previamente filtrada. Los PEC se evaluaron directamente.

3. Análisis de las interacciones en el PEC

Las interacciones entre el Q, AH y TPP fueron estudiadas empleando espectroscopía de IR haciendo uso de un espectrofotómetro de infrarrojo modelo 1310, marca PerkinElmer. La suspensión de PEC se centrifugó y posteriormente el residuo se secó por liofilización. La pastilla de KBr fue realizada a partir del sólido seco resultante empleando una prensa hidráulica para pastillas de IR marca PerkinElmer.

4. Estudio de la morfología

Para obtener las imágenes de AFM se hizo uso de un microscopio de fuerza atómica modelo Dimension Edge, marca Bruker. Las muestras se prepararon colocando una gota de la suspensión de PEC sobre una lámina de mica de sílice pulida y dejándola secar al vacío por espacio de 96 horas.

5. Análisis por microscopía óptica

El análisis por microscopía óptica se realizó directamente a la suspensión, colocando suficiente cantidad del líquido sobre una lámina de vidrio para microscopio. La imagen se tomó empleando un microscopio óptico modelo DMRXA con ajuste del zoom con montura C ajustable HC VARIO de aumento 0,33X-1,6X, marca Leica.

6. Ensayos de actividad antimicrobiana

El nanocompuesto fue ensayado mediante una modificación de la prueba cuantitativa para la determinación de la eficacia antimicrobiana de desinfectantes y antisépticos químicos de acuerdo con la

norma europea EN 1276 en circunstancias limpias y sucias a una temperatura de 25 °C. Las cepas empleadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cepa multiresistente de *Pseudomonas aeruginosa* de aislamiento clínico, y cepa de *Mycobacterium abscessus* tipo II de aislamiento clínico. Las cepas se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina «Dr. Jacinto Convit» de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Resultados y Discusión

ESTUDIO CUALITATIVO DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS

Los nanomateriales de los metales nobles como el Cu, Ag y Au exhiben un fenómeno óptico conocido como resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) que se manifiesta como una banda de absorción en las regiones del UV-Vis. En la Figura 1 se muestra el espectro de UV-Vis de una dispersión en agua de las CuNPs obtenidas. El máximo de LSPR para el cobre está reportado a alrededor de 580

nm (Xiong y col., 2011), sin embargo, factores como el tamaño y morfología de las nanopartículas tienen un impacto importante en el desplazamiento del máximo de la banda de LSPR. En este caso el máximo para las CuNPs preparadas se alcanza a 652 nm (Figura 1). Sería necesaria más información acerca de la morfología de las CuNPs obtenidas para explicar la posición del máximo de la banda.

ESTIMACIÓN DEL RADIO HIDRODINÁMICO

En la Figura 2 se muestra el histograma de frecuencia en función de la distribución de tamaños de una suspensión de CuNPs. De entrada, puede observarse que el diámetro hidrodinámico de las Nps obtenidas se encuentra dentro del rango de tamaño nanométrico, con una cota superior en aproximadamente 50 nm. Dado que la distribución se encuentra sesgada a la derecha, la media se encuentra desplazada hacia la derecha del máximo, por lo tanto, el diámetro hidrodinámico promedio para las CuNPs preparadas se encuentran alrededor de los 20 nm.

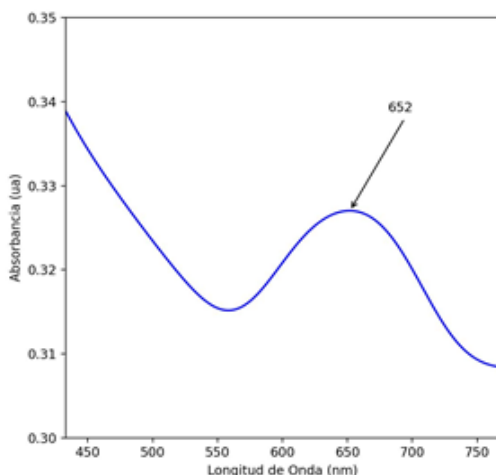


Figura 1. Espectro de UV-Vis de una suspensión acuosa de CuNPs

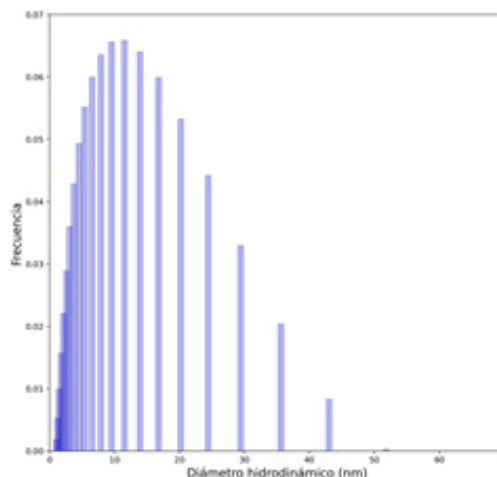


Figura 2. Histograma de frecuencia en función del diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de CuNPs

Por otro lado, en las Figuras 3 y 4 se muestran los histogramas de frecuencia en función de la distribución de tamaños de las suspensiones de PEC de Q/AH con y sin TPP, respectivamente. Los histogramas son muy similares con ligeras diferencias en las frecuencias. Los PEC que solo contenían Q/AH resultaron tener un tamaño ligeramente mayor al de los PEC que contenían TPP. Esto puede deberse al entrecruzamiento iónico con el TPP, lo que causaría que el PEC fuera más compacto. El radio hidrodinámico promedio para los PEC fue de aproximadamente 7 nm, mientras que para los que contenían TPP resultó ser de aproximadamente 5 nm.

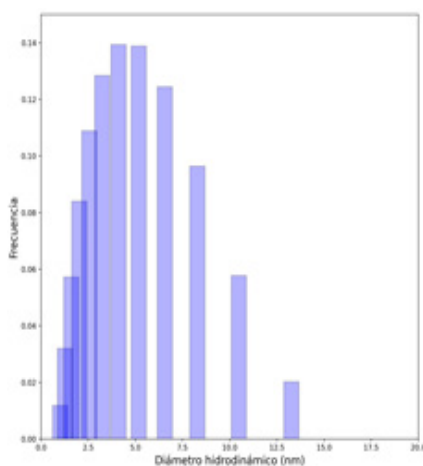


Figura 3. Histograma de frecuencia en función del diámetro hidrodinámico de una suspensión de PEC de Q/AH

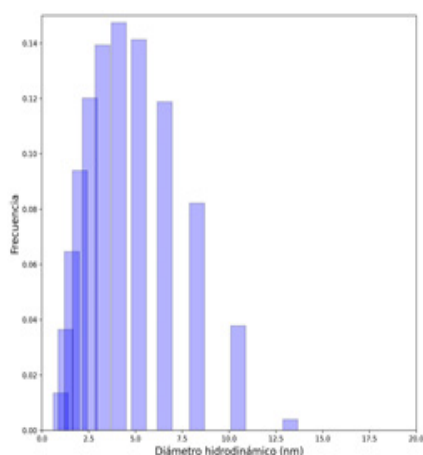


Figura 4. Histograma de frecuencia en función del diámetro hidrodinámico de una suspensión de PEC de Q/AH con TPP

ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES EN EL PEC

En la Figura 5 se muestran los espectros de infrarrojo por TFIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR), de quitosano (Q), ácido hialurónico (AH), tripolifosfato (TPP), complejos de polielectrolitos de quitosano-ácido hialurónico entrecruzados con tripolifosfato (Q/AH-TPP). Así, se observa que el quitosano (Q) exhibe una banda característica intensa y amplia en la región de $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, atribuible a las vibraciones de estiramiento solapadas de O-H y N-H participando en puentes de hidrógeno (Tomaz y col., 2018). Se observa además una banda ancha en la zona entre 2880 cm^{-1} atribuible a las vibraciones de estiramiento de C-H (Pretsch y col., 2020). La banda en 1651 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de C=O de amida (vibración de amida I) como un "hombro" característico del quitosano en el pico de flexión de N-H en 1599 cm^{-1} (vibración de amida II) (Knaut y col., 1999; Sacco y col., 2014; Tomaz y col., 2018). Las bandas de absorción en 1156 cm^{-1} (estiramiento antisimétrico del puente C-O-C) y 1088 cm^{-1} (vibraciones que involucran el estiramiento C-O de los carbohidratos) son picos característicos de la estructura del quitosano (Sacco y col., 2014; Tomaz y col., 2018).

Para el ácido hialurónico (HA), se observa la banda característica intensa y amplia en la región de $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, atribuible a las vibraciones de estiramiento solapadas de O-H y N-H de los grupos acetilo de las unidades de N-acetil-glucosamina participando en puentes de hidrógeno (Mohammed y Niamah, 2022). La vibración de estiramiento característica de C=O en amida (vibración amida I) se presenta en 1622 cm^{-1} y la vibración de flexión de N-H (vibración de amida II) en 1565 cm^{-1} .

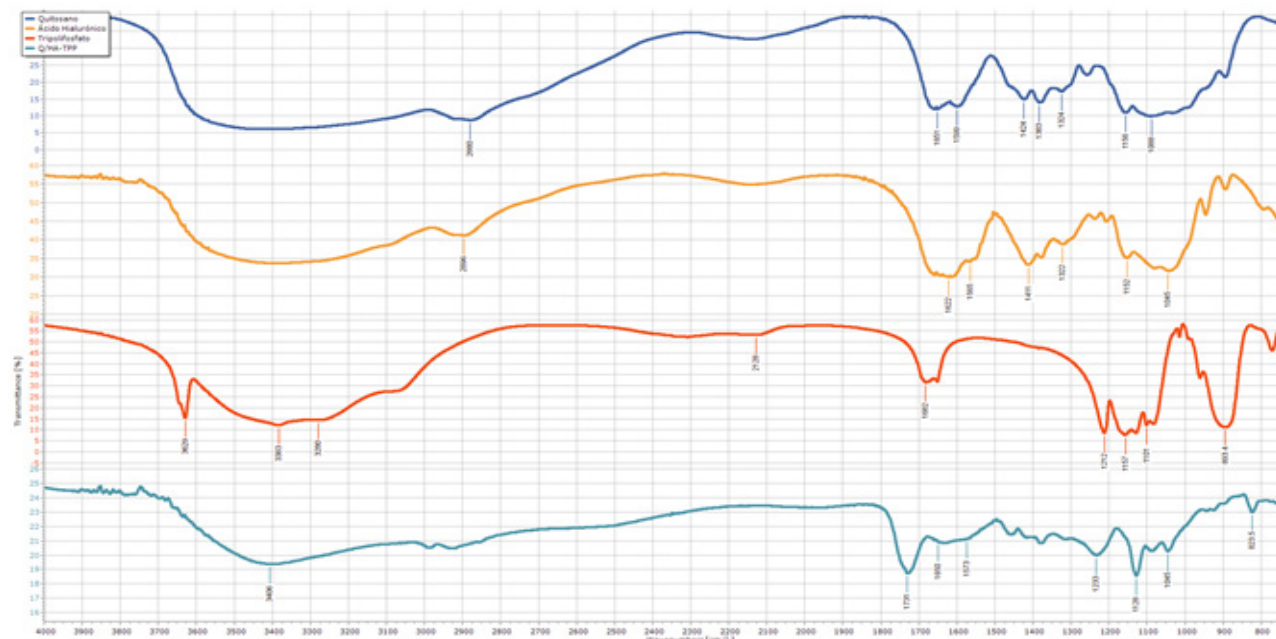


Figura 5. Espectros de infrarrojo por TFF (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR). De arriba hacia abajo: quitosano (Q), ácido hialurónico (AH), tripolifosfato (TPP), complejos de polielectrolitos de quitosano-ácido hialurónico entrecruzados con tripolifosfato (Q/AH-TPP)

Las vibraciones de estiramiento C-N se observan en 1411 cm^{-1} y finalmente en 1152 cm^{-1} y 1045 cm^{-1} las vibraciones de estiramiento C-O (Mohammed y Niamah, 2022).

El Tripolifosfato (TPP) muestra los siguientes picos característicos: estiramiento P=O en éster fosfato en 1682 cm^{-1} ; estiramiento P=O en 1212 cm^{-1} ; vibraciones de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo O-P=O en 1157 cm^{-1} ; vibraciones de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo PO_3 en 1101 cm^{-1} y vibraciones de estiramiento antisimétrico del puente P-O-P en 893 cm^{-1} (Sacco y col., 2014; Tomaz y col., 2018).

Por su parte, para los PEC de Q/AH-TPP, una de las diferencias significativas es la aparición de una banda intensa en 1128 cm^{-1} que se atribuye al estiramiento C-O. Se sabe que el número de grupos idénticos en una

molécula altera las intensidades relativas de las bandas de absorción en un espectro de IR (Fessenden y Fessenden, 1983), por lo que el aumento en la intensidad de esta banda respecto al Q y al AH puede deberse a la contribución tanto del Q como del AH en el PEC. Por otro lado, alteraciones en la vibración del enlace por efecto de grupos polarizantes produce cambios importantes en el momento de enlace, generando un aumento en la intensidad de la banda (Fessenden y Fessenden, 1983), en este caso por la presencia del TPP. Todo esto supone una interacción conjunta entre el Q/AH-TPP en el PEC. Se observa además una atenuación de las bandas de amida I y II por la interacción de los grupos amino cargados del Q y los grupos carboxilato del AH (Nath y col., 2015) y la aparición de una banda de intensidad relativa elevada en 1731 cm^{-1} correspondiente al estiramiento P=O en éster fosfato.

ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA

La topografía de los PEC se estudió mediante AFM en modo tapping. En las imágenes en 2D pueden observarse estructuras, en ambos casos, de entre 100 y más de 200 nm. Sin embargo, la imagen 3D muestra que la altura máxima en la zona estudiada era de alrededor de 7,7 nm para los PEC de Q/AH (Figura 6.A) y de 6,2 nm para los PEC de Q/AH-TPP (Figura 6.B). Esto puede sugerir la formación de agregados que conservan la altura media de la nanoestructura durante la evaporación en el proceso de preparación de las muestras. Alteraciones en la muestra como esta se han documentado para diferentes técnicas empleadas en la caracterización de materiales poliméricos en solución (Patterson y col., 2014; Insua y col., 2016).

Tomando este hecho en consideración, los tamaños concordarían con los obtenidos

por DLS. Además, se observa igualmente en este caso que la presencia del TPP en el PEC genera una reducción en el tamaño de la nanoestructura, también en concordancia con los datos obtenidos por DLS.

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Las imágenes mostraron que las CuNps se encontraban dispersas en la matriz de los PEC de Q/AH-TPP, evidenciando que la matriz es capaz de estabilizar las CuNps y evitar la formación de agregados (Figura 7).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la actividad bactericida se resumen en la Tabla I. La tabla muestra el promedio de dos ensayos realizados. Se ensayó el nanocompuesto empleando *Staphylococcus aureus*, como organismo modelo de las bacterias Gram-positivas;

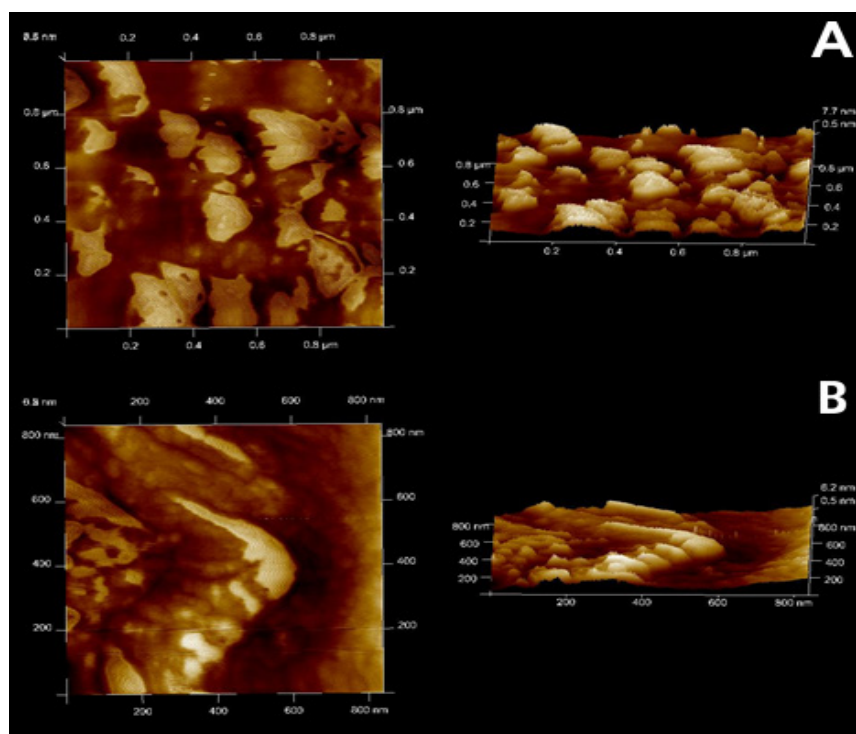


Figura 6. A) Imágenes de AFM 2D (izq.) y 3D (der.) de PEC de Q/AH. B) Imágenes de AFM 2D (izq.) y 3D (der.) de PEC de Q/AH con TPP

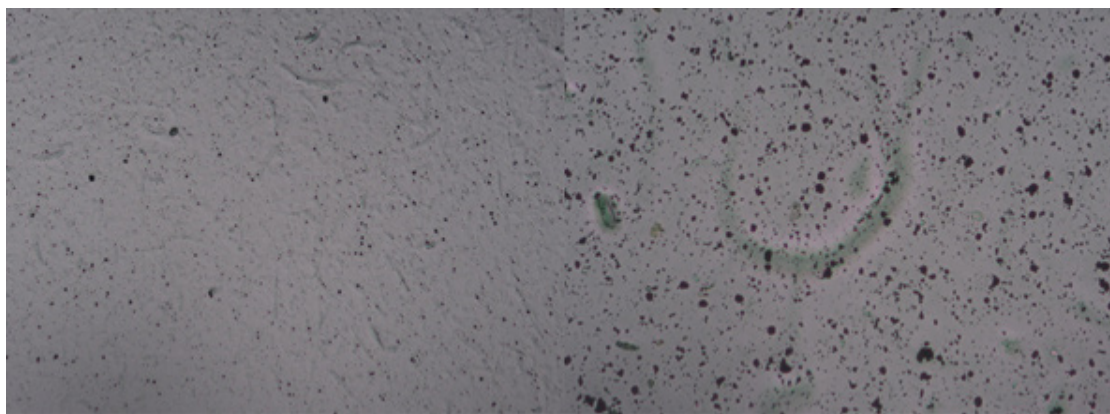


Figura 7. Imagen de microscopio óptico del nanocompuesto de PEC de Q/AH-TPP y CuNPs. A) Magnificación: 5X. Aumento: 0,33X. B) Magnificación: 5X. Aumento: 1,6X.

Tabla I.

Efecto bactericida del nanocompuesto con 200 µg/mL de CuNps con aumento en el tiempo de exposición en condiciones limpias y sucias

Microorganismo	Tiempo de exposición (min)	Condiciones limpias		Condiciones sucias	
		Log (η)	% Reducción	Log (η)	% Reducción
<i>S. aureus</i>	5	-	-	6,00*	100,00
	15	-	-	6,00*	100,00
	30	-	-	6,00*	100,00
	60	2,87	99,86	6,00*	100,00
	120	3,85	99,98	6,00*	100,00
<i>P. aeruginosa</i>	5	7,00*	100,00	7,00*	100,00
	15	7,00*	100,00	7,00*	100,00
	30	7,00*	100,00	7,00*	100,00
	60	7,00*	100,00	7,00*	100,00
	120	7,00*	100,00	7,00*	100,00
<i>M. abscessus</i>	5	0,88	86,92	1,03	90,77
	15	1,48	96,69	1,23	94,07
	30	1,75	98,23	1,68	97,92
	60	2,33	99,54	2,11	99,23
	120	7,00*	100,00	2,34	99,54

Pseudomonas aeruginosa para el caso de las bacterias Gram-negativas y *Mycobacterium abscessus* tipo II como representativa del género *Mycobacterium*, conocido por su elevada resistencia a la desinfección (Bello y col., 2006).

Los resultados muestran que el nanocompuesto fue eficaz frente a estas tres bacterias; sin embargo, hay dos factores a destacar: el primero fue la efectividad del nanocompuesto, a pesar de que la concentración de CuNps empleada fue de apenas 200 $\mu\text{g/mL}$ y segundo, el hecho de que *S. aureus* presentó mayor resistencia respecto a *P. aeruginosa*.

En general, las bacterias Gram-positivas muestran una mayor susceptibilidad a las Nps de cobre y sus óxidos (Ren y col., 2009; Ma y col., 2022) por lo que se requeriría una menor cantidad de Nps para lograr el efecto bactericida. De acuerdo a la literatura, la mayor resistencia de las bacterias Gram-negativas está relacionada con la pared celular característica de estas bacterias (Azam y col., 2012; Betancourt-Galindo y col., 2014; Wang y col., 2017). La pared celular de las bacterias Gram-negativas está compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos, que forman una barrera que sólo permite la entrada de macromoléculas (Wang y col., 2017; Gupta y col., 2019). En cambio, la pared celular de las bacterias Gram-positivas incluye una fina capa de peptidoglicano, así como ácido teicoico y abundantes poros que permiten el ingreso de moléculas extrañas, provocando daños en la membrana celular y la muerte de las células. Además, en comparación con las bacterias Gram-negativas, las bacterias Gram-positivas tienen una elevada carga negativa en la superficie de la pared celular, que puede atraer a las Nps (Wang y col., 2017; Gupta y col., 2019).

Se requerirían otros estudios para explicar de la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas a pesar de lo anteriormente expuesto, sin embargo, puede inferirse que los demás componentes del nanomaterial juegan un papel importante. La presencia de un exceso de quitosano en relación al ácido hialurónico, generaría un exceso de carga positiva en la superficie de los complejos de polielectrolitos, potenciando el efecto sobre la pared celular Gram-positiva. En relación a esto, Qi y col. (2004) sugieren que la actividad antimicrobiana del quitosano se debe a la disrupción de la pared celular, dada la densidad de carga positiva del polímero respecto a la densidad de carga negativa característica de las paredes celulares bacterianas. El aumento en la densidad de carga superficial en el pequeño tamaño de las Nps podría causar la lisis de la membrana externa Gram-negativa, exponiendo la membrana interna de menor grosor que en el caso de las bacterias Gram-positivas.

Por otro lado, se sabe que el ácido láctico también posee actividad antimicrobiana. Pasricha y col. (1979) encontraron que ácido láctico 0,1, 1 y 2% causa inhibición en el crecimiento de diversas cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Para el caso de *M. abscessus*, la evidencia en relación a este tipo de ensayos de susceptibilidad es escasa. Sin embargo, Cortesia y col. (2014) encontraron que el ácido acético al 6% eliminó eficazmente *M. abscessus* en 30 minutos. Además, el ácido propiónico al 6% también produjo una reducción importante de la viabilidad. Por lo tanto, podría esperarse una actividad similar para el ácido láctico.

Otro factor importante es la distribución de tamaños de las Nps. Se conoce que el tamaño y forma de las Nps contribuyen con su

rendimiento como agentes antimicrobianos (Dolai y col., 2021; Ma y col., 2022). Se ha sugerido que, debido a su pequeño tamaño y a su elevada relación superficie/volumen, las Nps pueden ejercer una mejor actividad antimicrobiana que los metales ordinarios y esta actividad mejora con la disminución del tamaño (Ma y col., 2022). Las Nps preparadas para la formulación del nanocompuesto presentaron tamaños menores a 50 nm con un promedio de 20 nm; Betancourt-Galindo y col. (2014) reportan tamaños menores a 20 nm y Ren y col. (2009) reportan tamaños de entre 20 y 95 nm. La cercanía entre los valores reportados y lo encontrado en esta investigación sugiere que debe haber otros factores influyendo en la actividad del nanocompuesto, debido a la reducción de los tiempos de actividad del nanocompuesto en relación con lo reportado. Betancourt-Galindo y col. (2014) y Ren y col. (2009), determinaron valores de concentración mínima inhibitoria de entre 250-3600 $\mu\text{g/mL}$ de CuNps para lograr el efecto bactericida en experimentos de 4 horas (Ren y col., 2009) y 16 horas (Betancourt-Galindo y col., 2014). Sin embargo, el nanocompuesto preparado en esta investigación reduce la viabilidad entre 6- Log_{10} y 7- Log_{10} empleando 200 $\mu\text{g/mL}$ de CuNps en el nanocompuesto en un tiempo de exposición de 2 horas.

Lo anterior podría sugerir que la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas respecto a las Gram-positivas se debe al efecto combinado de las nanoestructuras presentes en la formulación, a saber las CuNps y los PEC de Q/AH.

Conclusiones

Esta investigación representa un aporte al entendimiento del diseño de nanomateriales y su aplicación en el área biomédica. El

estudio mostró una posible sinergia entre los componentes del nanomaterial, lo que contribuyó a incrementar la acción antimicrobiana frente a organismos como *S. aureus* y *P. aeruginosa* respecto a la acción de los componentes individuales del nanomaterial, de acuerdo con la literatura. Por otro lado, dada la limitada literatura disponible acerca de la acción de nanomateriales frente a bacterias de elevada resistencia, como las del género *Mycobacterium*, este estudio muestra el potencial que tiene el empleo de nanocompuestos como potenciales agentes antimicrobianos con acción prolongada en el tiempo.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Productos Naturales y al Laboratorio de Espectroscopía Láser de la Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela por permitir el uso de sus espacios e instrumentación y al Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina «Dr. Jacinto Convit», Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela donde se realizaron los ensayos de cuantificación de la actividad antimicrobiana.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Adams FC, Barbante C. 2013. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. *Spectrochim Acta B* 86: 3-13.
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memić A. 2012. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and

- gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomed* 2012;6003-6009.
- Bello T, Rivera-Olivero IA, De Waard JH. 2006. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(5): 319-321.
- Betancourt-Galindo R, Reyes-Rodríguez PY, Puente-Urbina B, Ávila-Orta CA, Rodríguez-Fernández O, Cadenas-Pliego G, Lira-Saldívar RH, García-Cerda L. 2014. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *J Nanomater* 2014: 1-5.
- Borlow G, Gabbay J. 2004. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB J* 18(14): 1728-1730.
- Cortesia C, Vilchère C, Bermut A, Contreras W, Gómez K, De Waard J, Jacobs Jr WR, Kremer L, Takiff H. 2014. Acetic acid, the active component of vinegar, is an effective tuberculocidal disinfectant. *mBio* 5(2).
- Dolai J, Mandal K, Jana NR. 2021. Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Appl Nano Mater* 4(7): 6471-6496.
- Ealias AM, y Saravanakumar MP. 2017. A review on the classification, characterization, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 263.
- Fessenden RJ, Fessenden JS. *Química orgánica*. Grupo Editorial Iberoamérica: México D.F., México, 1983.
- Gómez Garzón M. 2018. Nanomateriales, nanopartículas y síntesis verde. *Repert Med Cir* 27(2): 75-80.
- Insua I, Wilkinson A, Fernandez-Trillo F. 2016. Polyion complex (PIC) particles: Preparation and biomedical applications. *Eur Polym J* 81: 198-215.
- Khodashenas B, Ghorbani HR. 2014. Synthesis of copper nanoparticles: An overview of the various methods. *Korean J Chem Eng* 31(7): 1105-1109.
- Knaut JZ, Hudson SM, Creber KAM. 1999. Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers. *J Appl Polym Sci* 72(13): 1721-1732.
- Ma X, Zhou S, Xu X, Du Q. 2022. Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. *Front Surg* 9.
- Mohammed AA, Niamah AK. 2022. Identification and antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from local isolates of *Streptococcus thermophilus*. *Mater Today: Proc* 60: 1523-1529.
- Nath SD, Abueva C, Kim B, Lee BT. 2015. Chitosan-hyaluronic acid polyelectrolyte complex scaffold crosslinked with genipin for immobilization and controlled release of BMP-2. *Carb Pol* 115: 160-169.
- Patterson JP, Robin MP, Chassenieux C, Colombani O, O'Reilly RK. 2014. The analysis of solution self-assembled polymeric nanomaterials. *Chem Soc Rev* 43(8): 2412-2425.
- Phul R, Kaur C, Farooq U, Ahmad T. 2018. Ascorbic acid assisted synthesis, characterization and catalytic application of copper nanoparticles. *Mater Sci Eng Int J* 2(4): 90-94.
- Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. 2020. Structure determination of organic compounds. Springer-Verlag GmbH Germany: Heidelberg, Alemania.
- Qi L, Xu Z, Xia J, Hu C, Zou X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res* 339(16): 2693-2700.
- Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents* 33(6): 587-590.
- Sacco P, Borgogna M, Travan A, Marsich E, Paoletti S, Asaro F, Grassi M, Donati I. 2014. Polysaccharide-Based networks from homogeneous Chitosan-Tripolyphosphate hydrogels: Synthesis and characterization. *Biomacromolecules* 15(9): 3396-3405.
- Schmid G (Ed.). *Clusters and Colloids: From Theory to Applications*. VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim, República Federal de Alemania, 1994.
- Tomaz AF, De Carvalho SMS, Barbosa RC, De Lima Silva SM, Gutiérrez MS, Lima AGB, Fook MVL. 2018. Ionically crosslinked chitosan membranes used as drug carriers for cancer therapy application. *Materials* 11(10): 2051.
- Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. 2020. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 382(16): 1564-1567.
- Wang L, Hu C, Shao L. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and Prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 12: 1227-1249.
- Warnes SL, Little ZR, Keevil CW. 2015. Human Coronavirus 229E Remains Infectious on

- Common Touch Surface Materials. *mBio* 6(6).
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Recuperado 2022, de <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>.
- Wu D, Delair T. 2015. Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions. *Carbohydr Polym* 119: 149-158.
- Xiong J, Wang Y, Xue Q, Wu X. 2011. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using L-ascorbic acid. *Green Chem* 13: 900-904.
- Yang L, Gao S, Asghar S, Liu G, Song J, Wang X, Ping Q, Zhang C, Xiao Y. 2015. Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its *in vitro* evaluation in glioma cells. *Int J Biol Macromol* 72: 1391-1401.



Desarrollo de gel tópico a base de ácido hialurónico y lidocaína para el tratamiento de úlceras bucales

Development of topical gel based on hyaluronic acid and lidocaine for the treatment of mouth ulcers

MARÍA V. DURAN MENDOZA¹, LORENA M. JIMÉNEZ BÁRCENAS², KEILY A. MORENO OROPEZA³,
RAUDET A. VILLAMIZAR CORTEZ⁴, ISABEL ANDUEZA⁵

Resumen

Las aftas, también llamadas «úlceras aftosas», son pequeñas lesiones superficiales que aparecen en los tejidos blandos de la boca o en la base de las encías, y pueden afectar a personas de cualquier edad y sexo. Dichas lesiones pueden ser dolorosas, irritantes y generar una incómoda inflamación a quienes la padecen y ser causante de problemas para comer y hablar. En el mercado venezolano se encuentran productos para mejorar estas patologías, sin embargo, no se cuenta con una presentación bajo la forma farmacéutica de gel que contenga propiedades mucoadhesivas, por lo que sería novedoso y útil el desarrollo de esta forma farmacéutica. **Objetivo:** Desarrollar un tópico bucal bajo la forma de gel con ácido hialurónico y lidocaína para la regeneración y anestesia de la mucosa bucal, de tal manera de alcanzar un pronto alivio y cicatrización. **Métodos:** Se planteó el desarrollo de geles acuosos empleando dispersiones de carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) al 1,5%, 2% y 2,5%; con ácido hialurónico al 0,2% y lidocaína clorhidrato al 2%. Como coadyuvantes se emplearon: Extracto de *Camellia sinensis* y Vitamina E. A las dispersiones elaboradas se les determinó la viscosidad, el pH y el deslizamiento a 26°C. **Resultados:** Los resultados demostraron que las concentraciones entre los rangos de 1,5% y 2% de (CMCNa) presentan mejor característica de fluidez, apropiada fuerza de extrusión y buenas propiedades organolépticas de apariencia.

Palabras clave: Ácido hialurónico, lidocaína, aftas, anestésico, cicatrizante, gel, tópico, bucal, fluido

Abstract

Canker sores, also called "aphthous ulcers," are small superficial lesions that appear in the mouth's soft tissues or at the base of the gums and can affect people of any age and sex. These lesions can be painful and irritating, cause uncomfortable inflammation in those who suffer from them, and cause problems when eating and speaking. There are products on the Venezuelan market to improve these pathologies. However, there is no pharmaceutical presentation in the form of a gel with mucoadhesive properties, so developing this pharmaceutical form would be novel and useful. **Objective:** To develop an oral topical in the form of a gel with hyaluronic acid and lidocaine for the regeneration and anesthesia of the oral mucosa to achieve prompt relief and healing. **Methods:** The development of aqueous gels using dispersions of sodium carboxymethylcellulose (CMCNa) at 1.5%, 2%, and 2.5% was proposed, with 0.2% hyaluronic acid and 2% lidocaine hydrochloride. The following adjuvants were used: *Camellia sinensis* extract and Vitamin E. The prepared dispersions' viscosity, pH, and slip resistance were determined at 26°C. **Results:** The results showed that concentrations between the ranges of 1.5% and 2% of (CMCNa) present better fluidity characteristics, appropriate extrusion force, and good organoleptic appearance properties.

Keywords: Hyaluronic acid, lidocaine, thrush, anesthetic, healing, gel, topical, oral, fluid

* Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización. Instituto de Investigaciones Farmacéuticas. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Correspondencia: mariavictoriaduranm@gmail.com

Orcid: [0009-0002-3164-1946](https://orcid.org/0009-0002-3164-1946)

[0009-0000-4403-872X](https://orcid.org/0009-0000-4403-872X)

[0009-0008-5262-6191](https://orcid.org/0009-0008-5262-6191)

[0009-0006-0040-0874](https://orcid.org/0009-0006-0040-0874)

[0000-0002-1585-862X](https://orcid.org/0000-0002-1585-862X)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.10](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.10)

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

Recepción: 04/11/2024

Aprobación: 15/11/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 236-246. 2024

Introducción

La mucosa bucal es un tejido que recubre el interior de la boca y los labios, que tapiza la cara interna de mejillas, labios, encías, paladar y parte inferior de la lengua. Esta mucosa está compuesta por una capa de células epiteliales del tipo escamoso estratificado, lo que significa que está compuesto por varias capas de células planas dispuestas en forma de escamas. Además del tejido epitelial, la mucosa bucal también está compuesta por tejido conectivo, que le confiere estructura y soporte. Este tejido conectivo está formado por fibras de colágeno y células especializadas, como los fibroblastos, que producen las sustancias necesarias para el mantenimiento de la mucosa bucal. En conjunto, estas capas forman una barrera protectora para la cavidad oral, la cual desempeña un papel crucial en la protección de los dientes y además forma parte del tracto digestivo. La mucosa bucal es un tejido delicado, flexible, húmedo y sensible que reviste el interior de la boca. Su función principal es proteger las estructuras internas de la boca y permitir las funciones de masticación y deglución. Presenta características de lenta cicatrización y es susceptible a lesiones debido a su constante contacto con alimentos y líquidos. Si existen cambios en la composición y la cantidad de saliva, pudiese verse afectada su función protectora, dando lugar a patologías como aftas (Rioboo y Bascones A, 2011), gingivitis y periodontitis, que prevalecen en personas de todas las edades, causando dolor y dificultades en la alimentación (Gómez y col., 2019). Las aftas se definen como un estado vesículo-ulceroso sobre una base eritematosa y fondo amarillento y pasan por una serie de periodos. La etiología aún sigue siendo desconocida.

Se le atribuye una causa multifactorial, con una posible base genética y la existencia de unos factores predisponentes como el trauma, el estrés, determinados alimentos, desequilibrio hormonal y tabaco (Gómez y col., 2019). Se estima que entre un 20 y un 60% de la población en algún momento de su vida se ha visto afectada por este tipo de lesiones (Bonet y Garrote, 2015; Angulo Núñez, 2015).

El cuidado adecuado de la cavidad bucal requiere la intervención de profesionales como el Odontólogo y el Farmacéutico, quienes pueden ofrecer soluciones a través de diagnósticos precisos y tratamientos efectivos. Actualmente en la República Bolivariana de Venezuela no se dispone de una forma farmacéutica de tipo gel bucal que aporte beneficios de cicatrización y anestesia para la aplicación en afecciones bucales, tales como aftas, que cursen con sangrado y dolor. En el mercado nacional se dispone de productos que poseen propiedades antisépticas, antiinflamatorias, cicatrizantes o anestésicas, sin embargo, no hay un producto que combine todos estos efectos. La oferta de productos para tratar estas afecciones con efecto cicatrizante es limitada, la mayoría de los que se encuentran comercializados son soluciones antisépticas y antiinflamatorias. En la actualidad, existen productos disponibles como tratamiento preventivo de dichas lesiones, en forma de soluciones para tocamientos, gargarismos y aerosol. Otro tratamiento es el uso de corticosteroides inyectados directamente en la mucosa, cuya aplicación es incómoda y generalmente dolorosa; así como la cauterización con agentes químicos en el consultorio odontológico (Beaty col., 2024).

Las formas farmacéuticas en gel ofrecen ventajas debido a que poseen mayor viscosidad que las soluciones (gargarismos

y colutorios), por lo tanto, se favorece la adherencia del producto, aumentando así el tiempo de contacto de los principios activos con la zona afectada, lo cual resulta beneficioso para el paciente ya que facilita el proceso de sanación disminuyendo el tiempo de padecimiento.

Debido a que el mercado farmacéutico venezolano carece de un medicamento en forma farmacéutica gel bucal, en este estudio se procedió a desarrollar una formulación de gel que contenga Ácido Hialurónico, Vitamina E, Té Verde y Lidocaína, que aporta ventajas como el mayor tiempo de contacto de los principios activos con los tejidos, que genere cicatrización y bloqueo de la señal dolorosa en la mucosa dando origen a la propuesta innovadora de asociar dichos activos en una base de gel mucoadhesivo, para dar un impacto significativo en la salud de aquellos pacientes que padezcan este tipo de lesión en la cavidad bucal. Es por ello que, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un gel tópico bucal a base de ácido hialurónico y lidocaína como alternativa terapéutica para el tratamiento de úlceras bucales, que posea características cicatrizantes y anestésicas en la mucosa oral. Con el añadido a la fórmula de ácido hialurónico se quiere lograr acelerar la cicatrización y aporta propiedades antiinflamatorias. El ácido hialurónico es un polisacárido lineal natural compuesto de unidades alternas de disacárido repetidas, ácido d-glucurónico y N-acetil-d-glucosamina, que forma parte de la matriz extracelular de muchos tejidos conectivos blandos, es biocompatible y ejerce efectos antiinflamatorios, antioxidantes, citostáticos y bacteriostáticos (Medina y Caraguay, 2019; Canciani y col., 2021; Basma y col.,

2023, Yakout y col., 2023). Recientemente, el ácido hialurónico comenzó a incluirse en una variedad de formulaciones destinadas a la administración tópica, incluidos enjuagues bucales y geles orales para el tratamiento de lesiones bucales. Se ha descrito como altamente biocompatible, biodegradable, con baja toxicidad, propiedades antibacterianas y curativas. Al respecto, Marques y col. (2024), evaluaron los efectos citotóxicos de diferentes geles tópicos a base de ácido hialurónico sobre fibroblastos gingivales humanos y bacterias orales, demostrando actividad citotóxica frente a *Streptococcus oralis* y actividad bacteriostática de los diferentes geles evaluados.

Por su parte la lidocaína, constituye un principio activo que proporciona características anestésicas (Franz-Montan y col., 2014). El clorhidrato de lidocaína es un activo usado como anestésico local debido a que bloquea la conducción nerviosa, previniendo el inicio y la propagación de las señales de dolor. Esta combinación de activos garantiza la eficacia y proporciona un efecto de alivio local a los pacientes afectados por diversas afecciones bucales. Con respecto al extracto de té verde, que se obtiene de las hojas de la planta *Camellia sinensis*, se sabe que posee propiedades antioxidantes, regenerativas, calmantes, astringentes e hidratantes (Bustamante, 2012, García, 2013).

Para lograr el objetivo se pretende:

1. Diseñar la fórmula farmacéutica final para la vía tópica bucal,
2. Establecer los métodos de manufactura para la fabricación del producto;
3. Especificar los controles en proceso de fabricación y controles de calidad del producto terminado.

Materiales y Métodos

La investigación es de tipo experimental y cuantitativa dado que la variable de estudio es manipulada y los datos son cuantificados. Por lo que en este estudio la variación de la concentración de carboximetilcelulosa sódica (CMCNa), fue fundamental para la determinación de las características físicas, y estabilidad del gel bucal a formular.

El estudio se inició con la revisión bibliográfica, mediante la cual se seleccionaron los principios activos y excipientes con características farmacológicas adecuadas para la indicación terapéutica y la vía de administración. Luego se seleccionaron los componentes para la formulación según los efectos farmacoterapéuticos y la vía de administración. Se estableció una fórmula tentativa que permitió iniciar la fase de pruebas para así obtener una fórmula farmacéutica con cualidades de estabilidad, eficacia y calidad. Las materias primas se obtuvieron del proveedor Distribuidora Jebian, C.A., sabiendo que están certificadas y ofrecen materias primas de alta calidad.

Los componentes de la formulación fueron: Clorhidrato de Lidocaína: Anestésico local; Dispersión de ácido hialurónico al 1%: cicatrizante, antiinflamatorio; Carboximetilcelulosa sódica (CMCNa): Polímero aniónico gelificante; Agua destilada: vehículo de la formulación; Extracto té verde: astringente y antibacteriano; Vitamina E: Antioxidante. Coadyuvante de cicatrización.

PROCESO DE MANUFACTURA A ESCALA PILOTO

Se prepararon por duplicado tres lotes del gel bucal a diferentes concentraciones

de carboximetilcelulosa sódica (1,5%, 2% y 2,5%) (Tabla I).

PREPARACIÓN DE LOS GELES

Se pesaron todos los componentes de la formulación. Previamente se tamizó la CMCNa en un tamiz n°270, luego se dispersó en la solución de los componentes de la fase A. Se dispersaron los componentes de la fase B con el agente tensoactivo y se incorporaron con agitación constante en la fase A. Posteriormente se ajustó el pH (Tabla I).

Se evaluaron las propiedades físicas 48 horas después de elaborados a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

1. Propiedades Organolépticas

Se tomaron porciones de 20 g de cada lote para evaluar el mejor aspecto posible del gel, de acuerdo con la opinión de los voluntarios. De esta manera se obtuvo un gel que cumpliera con un buen aspecto visual, hasta obtener un color uniforme. En cuanto al sabor se realizaron ajustes en los agregados de las esencia y edulcorante; se tomaron porciones pesadas de gel y se les añadieron cantidades medidas de esencia y edulcorante, ajustando hasta obtener un sabor agradable.

2. Determinación del pH

Los geles fueron previamente dispersados en agua destilada hasta una concentración de 2% p/p. Se utilizó un pHchímetro marca Orion Research Modelo S.A210, con un electrodo estándar combinado Ag/AgCl Triode TM, modelo 9157BNMD, de acuerdo con el método establecido en la USP-NF 2021 capítulo 791 (USP-NF, 2021, <https://www.uspnf.com/>

Tabla I.
Fórmula del gel bucal a diferentes concentraciones de CMCNa

Fase	Ingredientes	Fórmula n° 1 (%p/p)	Fórmula n° 2 (%p/p)	Fórmula n° 3 (%p/p)
A	Lidocaína clorhidrato	2	2	2
	Ácido Hialurónico al 1%	0,2	0,2	0,2
	E. F de Té Verde	1,6	1,6	1,6
	Conservante	csp	csp	csp
	Endulzante	csp	csp	csp
	Colorante	csp	csp	csp
	CMCNa	1,5	2	2,5
B	Agua destilada	csp	csp	csp
	Vitamina E	1	1	1
	Agente de sabor	csp	csp	csp
C	Agente Tensoactivo	csp	csp	csp
	Ajuste de pH	csp pH ≤ 4,5	csp pH ≤ 4,5	csp pH ≤ 4,5

Fuente. Elaboración propia

[official-text/proposal-statuscommentary/uspnf-2021](#)).

3. Determinación de la Viscosidad

Se empleó el método descrito por la USP-NF 2021, capítulo <912>, para un viscosímetro rotacional. Los valores de viscosidad se reportan en función del tipo de aguja empleada, la velocidad de rotación y la temperatura. Se realizó en un viscosímetro rotacional, Visco-Star Plus L, utilizando la aguja L4 a una velocidad de 1,5 revoluciones por minuto (r.p.m.). Los valores de viscosidad fueron expresados en miliPascal.segundos (mPa.seg) (USP-NF, 2021).

4. Deslizamiento

Se elaboró un diseño experimental fundamentado en medir el tiempo en el cual las muestras viscosas se desplazaban

para alcanzar una distancia previamente determinada, sobre una superficie lisa a un ángulo establecido de 45° de inclinación. La evaluación se realizó midiendo las distancias recorridas por los tres geles en un tiempo establecido de 5 minutos, para comparar cómo las diferentes concentraciones de CMCNa varían la fluidez para el desplazamiento y adhesividad de los geles (Calo y col., 2019).

Para evaluar la formulación más adecuada se aplicó un diseño experimental, el cual permite obtener información para el desarrollo de nuevos productos y procesos, que lleven a tomar una decisión más asertiva con la intención de tener una mejor calidad. Para ello se realizaron muestreos y análisis estadísticos de los datos. Los parámetros dependientes que se determinaron para evaluar las propiedades

de las dispersiones de los geles fueron: viscosidad y adherencia, y las variables independientes fueron la concentración de la carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) y tiempo de mezclado. En la Tabla II se muestran los valores de las pruebas previa. En la Tabla III se muestran los valores obtenidos del tiempo de mezclado.

La Tabla IV muestra los valores de pH obtenidos. Se muestran los valores obtenidos de viscosidad en la Tabla V, La evaluación de la adhesividad se realizó midiendo las distancias recorridas por

cada uno de los tres geles en un tiempo establecido de 5 minutos, así se comparó cómo las afectan las concentraciones de CMCNa a la fluidez para desplazamiento y adhesividad de los geles. Estas diferencias reológicas se atribuyeron a la diferencia de concentración de la dispersión de carboximetilcelulosa, que para la muestra N°1 el recorrido fue de 6 cm por lo tanto hay menos red de gel formadora de viscosidad presente en la formulación. La muestra N°2 mostró un recorrido de 3 cm por lo que posee mayor adherencia con respecto a la muestra N°1. A través de esta evaluación

Tabla II.

Condiciones para lote de 200g de experimental previo X₁ del gel bucal

Componente de la Fórmula	Muestra 1 (Concentración de CMCNa 1,5%)	Muestra 2 (Concentración de CMCNa 2%)	Muestra 3 (Concentración de CMCNa 2,5%)
Lidocaína	4g	4g	4g
Dispersión ácido hialurónico al 1%	40g	40g	40g
Extracto de té verde	3,2g	3,2g	3,2g
Humectante	csp	csp	csp
Conservante	csp	csp	csp
Vitamina E	2g	2g	2g
Agente tensoactivo	csp	csp	csp
Endulzante	csp	csp	csp
Acidulante	csp	csp	csp
Colorante	csp	csp	csp
Agentes de sabor	csp	csp	csp
CMCNa	3g	4g	5g
Agua destilada	137,4 g	136,4g	135,40g
Rango	1%	-	3%
<i>Fuente: Elaboración propia</i>			

Tabla III.
Condiciones para lote de 200g de experimental previo X₂ del gel bucal

Componente de la Fórmula	Muestra 1 (Concentración de CMC 1,5%)	Muestra 2 (Concentración de CMC 2%)	Muestra 3 (Concentración de CMC 2,5%)
Tiempo de Mezclado	17'45''	25'10''	27'50''
Rango	16''	-	28'50''
<i>Fuente: (Elaboración propia, 2024)</i>			

Tabla IV.
Valores reportados de pH

pH	Muestra N° 1	4,40
	Muestra N° 2	4,28
	Muestra N° 3	4,40
<i>Fuente: (Elaboración propia, 2024)</i>		

Tabla V.
Valores Reportados de Viscosidad

		Valores obtenidos (mPa.seg)	Promedio (mPa.seg)
		Muestra N° 1	63.964 74.712
Viscosidad	Muestra N° 2	221.544 230.626	226.085
		Muestra N° 3	485.129 453.580
Temperatura: 26°C Aguja N° 4 Velocidad: 1,5 RPM			
<i>Fuente: (Elaboración propia, 2024)</i>			

se concluye que, a mayor concentración de CMCNa, mayor será la adherencia obtenida. Sin embargo, a pesar que la muestra N°3 presentó mayor adherencia ya que mostró

un recorrido de 1,8 cm, no presentó buenas propiedades organolépticas al tacto, debido a que presentó una alta consistencia que generó la disminución de la fluidez, Tabla VI.

Tabla VI.
Valores reportados de adhesividad

Adhesividad	Muestra N° 1	6cm
	Muestra N° 2	3cm
	Muestra N° 3	1,8cm

Fuente: (Elaboración propia, 2024)

Para evaluar la formulación más adecuada se aplicó un diseño experimental conocido como Método Experimental Diseño Factorial (Fernández Bao, 2020). Los diseños factoriales son los más utilizados en los experimentos con dos o más factores, es decir, con dos o más variables independientes, las cuales serán analizadas al ser consideradas por el investigador como variables que afectan al proceso. Esta estrategia permitió la planificación de ensayos de manera tal que las conclusiones relevantes sean alcanzadas en forma eficiente y económica. Para ello se aplicó el diseño estadístico Factorial de dos niveles y dos factores, donde los parámetros dependientes que se

determinaron para evaluar las propiedades de las dispersiones de los geles fueron la viscosidad y adherencia, y las variables independientes fueron la concentración de la carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) y tiempo de mezclado.

Niveles de los factores

Se evaluaron dos niveles.

Selección del método experimental:
Método experimental simultáneo.

Selección del diseño experimental:
Método Experimental Diseño Factorial.

Identificación de las Variables (Tabla VII)

- **Variables Independientes:** $X_1 =$ Concentración de carboximetilcelulosa sódica (1%-3%) / $X_2 =$ Tiempo de mezclado de carboximetilcelulosa sódica (16"- 28'50")
- **Variables dependientes:** $Y_1 =$ Viscosidad de los geles / $Y_2 =$ Adherencia de los geles.

Tabla VII.

Identificación de las Variables

		Codificación
Variable independiente	Tiempo de mezclado	X1
	Concentración de CMCNa	X2
Variable dependiente	Viscosidad de los geles	Y1
	Adhesividad de los geles	Y2
Fuente: (Elaboración propia, 2024)		

Tabla VIII.

Identificación de centroides y variables

Muestra seleccionada: Muestra 2	
Centroide:	2% CMCNa / 25'10"
Distancia	0,5% / 1"

Fuente: (Elaboración propia, 2024)

Diseño Factorial: Niveles Factores: $2^2 = 2 \times 2 = 4$ experimentos

$X_{real} = X_{codificado} \times distancia + centroide$

Resultados, Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

En el presente trabajo se propuso desarrollar un producto farmacéutico en forma de gel tópico bucal como alternativa terapéutica para el tratamiento de úlceras bucales. Para lograr esto, se realizaron experimentaciones y modificaciones en las técnicas de manufactura hasta obtener una que cumpliera con elegancia farmacéutica, fluidez y aparente estabilidad en el tiempo. Para ello, se realizaron pruebas preliminares en las que se evaluaron concentraciones de CMCNa al 2%, 3% y 4%. De estas se determinó que la concentración del 2% constituye la mejor alternativa. A continuación, se prepararon tres lotes adiciones de concentraciones variadas de CMCNa de 1,5%, 2% y 2,5% y se evaluaron diferentes parámetros como viscosidad, pH y adhesividad. Posteriormente, se seleccionó como centroide la concentración del 2% con su tiempo de mezclado de 25'10" y las distancias de 0,25% y 1', respectivamente, para cada experimento del diseño factorial. La carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) es el único derivado de celulosa incluido dentro del grupo de los polielectrolitos. Las propiedades reológicas de las soluciones

acuosas de CMCNa dependen no solo de la concentración y la masa molecular del polímero (Enoch y Somasundaram, 2023; Wagner y col., 2023). Basándose en sus propiedades, principalmente la capacidad de contribuir a la consistencia deseada de los productos, la carboximetilcelulosa sódica se ha abierto camino en una variedad de sectores industriales, con aplicaciones principalmente en la producción de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos.

Empleando la ecuación de decodificación de diseño, se obtuvieron los valores para cada una de las variables independientes: Tiempo de mezclado y concentraciones de CMCNa, de esta manera se escogieron los valores considerados para una formulación más acorde a lo esperado. En la Tabla IX se muestran los valores obtenidos para la producción final del gel posterior a realizar el diseño factorial.

Este estudio tiene limitaciones ya que, al obtener la fórmula final, lo ideal sería

evaluar las características antiinflamatorias y cicatrizantes del ácido hialurónico y la posible garantía de incorporación de los activos propuestos en la forma farmacéutica. Igualmente hubo limitación en la posibilidad de evaluar el estimado de tiempo donde se de garantía de una pronta mejoría de los pacientes y alcanzar esa meta profesional.

Aunque se logró un avance significativo en el diseño de la formula propuesta, se recomienda continuar con futuras investigaciones que incluyan el análisis microbiológico con el fin de evaluar la presencia de microorganismos patógenos en el producto para garantizar su seguridad y eficacia; los ensayos de estabilidad en el tiempo para determinar el período de validez del producto; la evaluación de las materias primas para verificar que cumplan con las concentraciones establecidas para asegurar la calidad del producto. Finalmente, evaluar la posibilidad de sustituir el agente antimicrobiano por clorhexidina, que ha sido reportado como

Tabla IX.
Fórmula final

Componentes	% p/p	Cantidad en g
Lidocaína clorhidrato	2%	4g
Ácido hialurónico	0,2%	40g
E. F.de té verde	1,6%	3,2g
Agente antimicrobiano	csp	csp
Endulzante	csp	csp
Colorante	csp	csp
Carboximetil celulosa sódica	1,75%	3,5g
Agua destilada	csp	136,9 mL
Vitamina E	1%	2g
Agente de sabor	csp	csp
Agente tensoactivo	csp	csp
Ajustes de pH	pH 4,5	csp
<i>Fuente: (Elaboración propia, 2024)</i>		

la opción principal para productos bucales (Poppolo Deus y col., 2022). Al respecto, Ripollés de Ramon (2020) en un estudio clínico piloto de la eficacia de un gel de ácido hialurónico 1% y clorhexidina 0,20% post-extracción dental, demostró que las aplicaciones tópicas de ácido hialurónico al 1% junto con la clorhexidina al 0,20% influyen de manera positiva en cuanto a la cicatrización del tejido blando post extracción dental, sin embargo, no parece que tenga efectos beneficiosos en cuanto a los niveles de dolor oral post-intervención.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Angulo Núñez JJ. 2015. Características, condiciones orales y lesiones bucales encontradas en pacientes de centros odontológicos de Mérida (República Bolivariana de Venezuela). Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Departamento de Estomatología, Granada.
- Basma Khalil Y, Fatma Ramzy K, Maha Abd El-Aziz Abou, K, Lamia Ahmed HH, Gillan Ibrahim EK. 2023. Efficacy of hyaluronic acid gel and photobiomodulation therapy on wound healing after surgical gingivectomy: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health* 23(805).
- Beaty CS, Short AG, Mewar P. 2024. Oral mucosal lesions, immunologic diseases. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK597383/>
- Bonet R, Garrote A. 2015. Aftas Bucales. *Farmacia Profesional* 29(1).
- Bustamante SM. 2012. Té Verde, Fitomedicamento contra la influenza A: Rol de las Catequinas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 106-110.
- Calo K, Vieira ME, Andueza I. 2019. Aplicación de un diseño estadístico experimental para determinar la influencia de variables instrumentales en las propiedades mecánicas de dispersiones poliméricas. *Revista de La Facultad de Farmacia* 82(1 y 2):55-64.
- Canciani E, Sirello R, Pellegrini G, Henin D, Perrotta, Toma M, Khomchyna N, Dellavia C. 2021. Effects of vitamin and amino acid-enriched hyaluronic acid gel on the healing of oral mucosa: in vivo and in vitro study. *Medicina* 57(3):285.
- Enoch K, Somasundaram AA. 2023. Rheological insights on Carboxymethyl cellulose hydrogels. *Int J Biol Macromol* 253(Pt 8):127481.
- Fernández Bao S. 2020. Diseño Experimental: Diseño Factorial. Máster Universitario, Universidad Politécnica de Cataluña, Escuela de Ingeniería de Barcelona. Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM_Fernandez_Bao_Sheila.pdf?sequence=1
- Franz-Montan M, Baroni D, Brunetto G, Vieira Sobral VR. 2014. Liposomal lidocaine gel for topical use at the oral mucosa: characterization, *in vitro* assays and in vivo anesthetic efficacy in humans. *Journal of Liposome Research* 25(1).
- García KR. 2013. Efecto Antibacteriano de una Infusión de *Camellia sinensis* (Té Verde) usada como colutorio sobre placa bacteriana y saliva. Echegaray de Trujillo.
- Gómez ME, Campos A, Crespo PV, Durand D, Rodriguez CA. 2019. Mucosa oral y órganos de la cavidad bucal. En ME De Ferraris, AC Muñoz, Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental (págs. 91-127). Ciudad de México: Médica Panamericana, S.A.
- Marques AFS, Silva NM, da Cruz M, Marques J, da Mata AD. 2024. Hyaluronic acid-based gels for oral application: Comparison of in vitro effects on gingival cells and bacteria. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 14(3):238-244.
- Priscilla Medina Sotomayor P, Astrid Caraguay Condoy A, Alvarez Arteaga TC. 2019. Uso del Ácido Hialurónico en odontología: Revisión Bibliográfica. *Revista Killkana Salud y Bienestar* 3(3)43-50.
- Poppolo Deus F, Ouanounou A. 2022. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J* 72(3):269-277.
- Rioboo M, Bascones A. 2011. Aftas de la mucosa oral. *Avances en Odontoestomatología* 27(2).
- Ripollés de Ramón JSS. 2020. Estudio clínico piloto de la eficacia de un gel de ácido hialurónico

- 1% y clorhexidina 0,20% postextracción dental. *Científica Dental* 17(3).
- Wagner P, Róžańska S, Warmbier E, Frankiewicz A, Róžańska J. 2023. Rheological Properties of Sodium Carboxymethylcellulose Solutions in Dihydroxy Alcohol/Water Mixtures. *Materials*16(1).
- Yakout BK, Kamel FR, Khadr M, Hassan LA, El Kimary G. 2023. Efficacy of hyaluronic acid gel and photobiomodulation therapy on wound healing after surgical gingivectomy: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health* 23(805).



Evaluación comparativa entre los perfiles de disolución de tabletas de Clorhidrato de Propranolol genéricas del mercado Venezolano y el Importado

Comparative evaluation between the dissolution profiles of generic Propranolol Hydrochloride tablets from the Venezuelan market and the Imported market

JANESKY AGUDELO¹, JENNIFFER TOVAR², MARISABEL BOR³

Resumen

Se realizó un estudio comparativo de perfiles de disolución de clorhidrato de propranolol 40 mg en tabletas. La comparación se realizó entre un medicamento genérico importado contra un producto de referencia genérico nacional, en medios de disolución a diferentes pH y en agua desionizada. Este principio activo pertenece a la clase 1 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), posee una alta solubilidad y alta permeabilidad, lo que permite realizar un estudio de bioexención como una posible alternativa a un estudio de bioequivalencia, con la finalidad de determinar si existe similitud entre ambos medicamentos. Se encontró que los perfiles de disolución entre ambos fármacos son similares, donde no existe diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, al realizar el ensayo de valoración y uniformidad de contenido, el producto de origen importado no cumple con las especificaciones consultada en la literatura.

Palabras clave: Disolución, perfiles de disolución, Propranolol, SCB, prueba de liberación *in vitro*, medicamentos genéricos

Abstract

A comparative study of dissolution profiles of propranolol hydrochloride 40 mg in tablets was carried out. A comparison was conducted between an imported generic drug and a national generic reference product in dissolution media at different pH levels and deionized water. This active ingredient belongs to class 1 of the Biopharmaceutical Classification System (SCB); it has high solubility and high permeability, which allows a bioexemption study to be carried out as a possible alternative to a bioequivalence study to determine if there is a similarity between both medications. It was found that the dissolution profiles between both drugs are similar, where there is no significant difference between them. However, when carrying out the assessment and content uniformity test, the imported product does not meet the specifications according to the consulted literature.

Keywords: Dissolution, Dissolution profiles, Propranolol, BCS, *in vitro* release test, generic medications

Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia UCV. Correspondencia: Apdo. 40109 - Caracas 1040A, Venezuela. agudelojanesky61@gmail.com; marisabel.bor@gmail.com

Orcid: [10009-0002-9642-2496](https://orcid.org/0009-0002-9642-2496)
[20009-0003-8187-0365](https://orcid.org/0009-0003-8187-0365)
[300009-0009-4422-9054](https://orcid.org/00009-0009-4422-9054)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.11](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.11)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 08/11/2024
Aprobación: 15/11/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 247-256. 2024

Introducción

La hipertensión arterial se ha convertido en un grave problema de salud pública en el mundo y en Venezuela. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 1.280 millones de adultos de 30 a 79 años de edad en todo el mundo padecen hipertensión, la mayoría (dos tercios) de los cuales viven en países de ingresos bajos y medios. Se estima que el 46% de los adultos con hipertensión no saben que padecen esta afección. Menos de la mitad de los adultos (42%) con hipertensión reciben un diagnóstico y reciben tratamiento. Aproximadamente 1 de cada 5 adultos (21%) con hipertensión la tienen bajo control. La hipertensión es una de las principales causas de muerte prematura en todo el mundo. Una de las metas mundiales en materia de enfermedades no transmisibles es reducir la prevalencia de la hipertensión en un 33% entre 2010 y 2030 (OMS, 2023a). El Perfil de Salud Nacional para Hipertensión Arterial en Venezuela en el 2023, publicado por la OMS, revela que la incidencia de la patología es similar en hombres y mujeres (40 y 39%, respectivamente), afectando principalmente a personas entre 30 y 79 años. De los 5,3 millones de adultos en este rango de edad, un 72% ha sido diagnosticado, un 63% recibe tratamiento, pero solo un 33% logran un adecuado control de la presión arterial (OMS, 2023b).

El Clorhidrato de Propranolol es un antagonista β -adrenérgico competitivo no selectivo, por lo que bloquea la acción de la epinefrina y la norepinefrina tanto en los receptores adrenérgicos β_1 como en los receptores adrenérgicos β_2 . Se utiliza en el tratamiento de la hipertensión, el feocromocitoma, el infarto de miocardio, las arritmias cardíacas, la angina de pecho

y la miocardiopatía hipertrófica. También se utiliza para controlar los síntomas de hiperactividad simpática en el tratamiento del hipertiroidismo, los trastornos de ansiedad y el temblor. Otras indicaciones incluyen la profilaxis de la migraña y del sangrado gastrointestinal superior en pacientes con hipertensión portal (Goodman & Gilman, 1996; Katzung y Trevor, 2017, Al-Majed y col., 2017). Pertenece a la Clase 1 en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) desarrollada por Amidon y col. (1995), aceptado y adecuado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, 2024) y difundido actualmente a nivel mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2023b), lo que indica que tiene una alta solubilidad y alta permeabilidad, por lo tanto aplica para estudios de bioexención que es una alternativa al estudio de bioequivalencia *in vivo* por medio de la demostración de equivalencia terapéutica *in vitro*.

Actualmente en Venezuela, aun cuando contamos con una industria farmacéutica local, el Estado procura complementar la producción nacional con establecimientos de expendio de fármacos importados, como alternativa para disminuir la carga financiera de los costos de las enfermedades, garantizando a la población el rápido y económico acceso a los medicamentos. La industria farmacéutica juega un papel crucial en la salud pública, proporcionando medicamentos seguros y eficaces. Para garantizar que estos medicamentos cumplan con los estándares más altos, el control de calidad en farmacia es esencial. El control de calidad en farmacia se refiere a los procedimientos y medidas implementados para asegurar que los productos farmacéuticos cumplan con los estándares predefinidos de calidad, seguridad y eficacia. Estos estándares son

establecidos por organismos reguladores como la FDA en Estados Unidos o la EMA en Europa, y cubren todo el proceso de producción, desde la materia prima hasta el producto final.

Uno de los análisis que se realizan a los medicamentos son los estudios de disolución que permiten su aplicación en los laboratorios de control de calidad y son útiles para predecir las características de absorción de los fármacos, mostrando con claridad las deficiencias en la liberación y disponibilidad fisiológica del principio activo en la formulación (Cid, 1981). Si bien los ensayos de disolución se encuentran ampliamente difundidos hoy en día, son escasos los estudios que se han realizado en nuestro país, sobre medicamentos a base de clorhidrato de propranolol y siendo un fármaco de enorme atención clínica por su eficacia en el tratamiento de la hipertensión arterial y las profilaxis del infarto de miocardio y de la migraña (Al-Majed y col., 2017), se propuso estudiar tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg de liberación inmediata, comparando un producto genérico importado por el Estado con otro producto genérico (producto de referencia) elaborado por la industria farmacéutica nacional.

Los productos se analizaron siguiendo los ensayos de calidad especificados por la farmacopea (USP 44 NF 39, 2021), contemplando las características organolépticas, ensayos fisicoquímicos como: ensayo de disolución y uniformidad de contenido, comprobando que cumplan con las especificaciones.

Los ensayos se elaboraron mediante perfiles de disolución en cuatro medios: solución de ácido clorhídrico 0,1N pH 1,2, buffer acetato pH 4,5, buffer fosfato pH

6,8, y agua desionizada, con puntos de muestreo en los tiempos: 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos, graficando y señalando los porcentajes del fármaco disuelto en función del tiempo en que se tomó la muestra (OMS 2023, a,b), evaluando de esta manera la eficiencia de la disolución y el tiempo medio de disolución, así como también se realizaron los cálculos de coeficientes de diferencia (f1) y coeficientes de similitud (f2), con la finalidad de comprobar la equivalencia terapéutica y garantizar su intercambiabilidad (Jung Cook y col., 2012).

Metodología

TIPO O DISEÑO DEL ESTUDIO

La presente investigación es un estudio experimental. Los estudios de los perfiles de disolución se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Medicamentos "Dr. Carlos Ruiz Alonso", que es un laboratorio perteneciente a la mención Control de Calidad de Medicamentos, ubicado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

SELECCIÓN DEL PRODUCTO DE REFERENCIA Y DEL PRODUCTO TEST

Las directrices de la OMS en el Informe 36, Anexo 11, *Orientación en la selección de un producto farmacéutico comparador para la evaluación de productos farmacéuticos multifuentes*, sirvieron como guía para el procedimiento de selección de muestra.

En la base de datos del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR) se encuentra un listado de todos los productos farmacéuticos registrados a nivel nacional, para el Principio Activo Clorhidrato de Propranolol de 40 mg se encontró que el

producto innovador correspondía a Inderal® de Laboratorios AstraZeneca Venezuela S.A., éste producto actualmente no se encuentra en comercio en el país, por lo que se toma la decisión de utilizar un genérico de otro laboratorio como producto comparador.

Para el estudio, se tomó en consideración aquellos productos farmacéuticos de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg inscritos en el Listado de Especialidades Farmacéuticas Registradas suministrado por INHRR. Se realizó una búsqueda en las farmacias a nivel nacional, para adquirir el producto de referencia bajo condiciones adecuadas de almacenamiento.

Igualmente se realizó la misma búsqueda en los establecimientos móviles suministrados por el Estado para adquirir la muestra del producto test en condiciones de almacenamiento extremas.

Para la selección del producto Test (multifunte), se tomó la decisión de ubicar muestras de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg que son vendidas a través de establecimientos móviles de expendio de fármacos importados por el Estado.

Se determinó que el producto farmacéutico de referencia para las tabletas de Propranolol de 40 mg como el producto Genérico del Laboratorio venezolano PlusAndex, debido a que se realizó un estudio de mercado y se encontró que, el medicamento posee amplia demanda debido a su costo razonable, y además se verificó que la calidad del producto es reconocida y documentada.

Se eligió como producto farmacéutico Multifunte a las tabletas de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg del Seldom Pharma

PVT, LTD, el mismo corresponde a un Producto Genérico importado por el estado venezolano desde la India.

Se adquirieron 100 tabletas de cada medicamento en estudio, verificando que cada uno de ellos presentaba el mismo número de lote.

El Criterio de Inclusión para el Producto de Referencia fue Tablet de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg que cumplan con los requisitos de calidad y para el Producto Test fue tabletas de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg importados al país.

El Criterio de Exclusión fue tabletas de Clorhidrato de Propranolol con empaque primario abierto, dañado o roto, igualmente aquellas que tengan fecha de vencimiento expirada.

En la Tabla I se muestran las condiciones analíticas aplicadas en los perfiles de disolución para tabletas de clorhidrato de propranolol. Los medios de disolución fueron preparados de acuerdo con las indicaciones de la USP 44 NF 39, desgasificados previamente. En primer lugar, se calentaron hasta 40°C, se filtraron al vacío con membrana de 5 μ m y se colocaron en un baño de ultrasonido por 15 minutos.

Los perfiles de disolución se realizaron en un disolutor Marca Hanson Research SR2, utilizando para cada medio 12 tabletas de cada tipo de Producto Farmacéutico (Nacional e Importado). En los tiempos especificados se realizó toma de muestra para cada vaso y se filtró con filtros de 5 μ m. Es importante señalar que no se realizó reposición de medio de disolución. Posteriormente, las muestras fueron cuantificadas por medio del Espectrofotómetro de Absorción

Tabla I.

Condiciones analíticas aplicadas en los perfiles de disolución para tabletas de clorhidrato de propranolol

Aparato 1	100 rpm
Volumen del medio de Disolución	1000 mL
Medios de Disolución utilizados para los Perfiles	1. Ácido Clorhídrico 0,1 N pH: 1,2. 2. Buffer Acetato pH: 4,5 3. Buffer Fosfato pH: 6,8 4. Agua Desionizada. (según lo requerido en el INHHRR)
Tiempos de Muestreo	5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos durante el ensayo

Ultravioleta Marca Shimadzu UV-1201, a la longitud de onda de máxima absorción de 290 nm y celdas de cuarzo de 1 cm de grosor. Para la determinación del porcentaje (%) de fármaco disuelto en cada uno de los medios utilizados, se preparó una curva de calibración con el patrón de Clorhidrato de Propranolol a concentraciones comprendidas entre 0,01 y 0,06 mg/mL.

Con los datos obtenidos, para cada medio de disolución se procedió a graficar los porcentajes disueltos y calcular el Factor de diferencia (f_1) y el Factor de Similitud (f_2). Se considero como Criterios de aceptación al valor de Factor de diferencia (f_1) entre 0 y 15, siendo 0 la ideal y El Factor de similitud (f_2) se consideró aceptable entre 50 y 100, siendo 100 el ideal.

Resultados y Discusión

En la Tablas II y III, y en las Figuras 1 a la 4, se muestran los perfiles de disolución comparativos para los productos estudiados realizado en diferentes medios de disolución, según lo establecido por la FDA. Los resultados se expresaron sobre la base de cálculos estadísticos que permitieron determinar porcentajes de fármaco disuelto y los factores de diferencia (f_1) y factores de similitud (f_2) en cada medio de disolución. Los resultados indican que no existe diferencia significativa entre ambos productos, ya que los valores de f_1 fueron menores a 10 y f_2 fueron mayores a 50. Igualmente se observa que, para ambos medicamentos, los perfiles de disolución frente a los diferentes medios empleados son similares, ya que no existe diferencia significativa entre ellos. Por lo tanto, cumplen con las especificaciones establecidas.

UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN <905> DE TABLETAS DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL

A pesar de que los perfiles de disolución de ambos medicamentos son similares y cumplen con las especificaciones establecidas, la presencia de partículas sin disolver en el producto importado representa una anomalía que requiere mayor investigación. Por lo que la uniformidad de contenido es un aspecto crucial de la calidad farmacéutica, y este hallazgo justifica la realización de análisis más profundos para garantizar la seguridad y eficacia del producto importado. Por ello, se realizó evaluaciones de la Uniformidad de Contenido según la USP 44 NF 39 de

Tabla II.

Resultados de los Perfiles de Disolución en los cuatro medios comparativos de las Muestras de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg Producto: Nacional e Importado

t (min)	HCl pH= 1,2±0,05				BUFFER ACETATO pH= 4,5±0,05				BUFFER FOSFATO pH= 6,8±0,05				AGUA DESIONIZADA			
	NACIONAL		IMPORTADO		NACIONAL		IMPORTADO		NACIONAL		IMPORTADO		NACIONAL		IMPORTADO	
	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)	%DIS	DER (%)
0	0	0	0	0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
5	96,8	1,7	92,4	7,1	96,42	2,2	91,38	6,7	93,68	1,9	87,85	9,4	92,18	5,2	90,22	10,4
10	97,4	1,9	93,2	7,5	95,42	1,6	90,89	6,8	97,71	1,9	89,66	8,2	98,01	6,2	90,95	10,3
15	96,9	2,2	93,2	7,8	95,22	2,3	91,06	6,8	97,76	1,6	89,79	8,5	99,59	5,4	90,55	12,9
20	96,9	2,2	93,2	7,7	95,26	2,1	90,92	6,9	97,97	1,7	89,65	8,6	100,67	5,7	90,88	13,6
30	96,6	2,2	93,1	7,4	95,08	2,2	90,88	6,9	97,87	1,7	90,05	8,5	101,90	5,4	91,48	13,1
40	96,4	2,2	93,7	7,9	95,34	1,9	90,88	6,8	97,66	2,2	90,39	8,3	101,99	5,4	92,19	12,5

%DIS: % DISUELTO

Tabla III.

Factores de Diferencia y de Similitud de los cuatro medios comparativos de las Muestras de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg Producto: Nacional e Importado

	HCl pH 1,2 0,05	Buffer Acetato pH 4,5 0,05	Buffer Fosfato pH 6,8 0,05	Agua Desionizada
Factor de diferencia (f₁)	3,85	4,67	7,76	8,08
Factor de similitud (f₂)	78,73	75,49	64,76	62,32

las Muestras de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg del Producto Nacional e Importado, y como los indica las Tabla IV a la VI y la Figura 5, al realizar los diferentes ensayos de Control de Calidad según lo establecido la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 44 NF 39), como lo es la uniformidad de contenido y la valoración de Clorhidrato de Propranolol, se evidencia que el medicamento importado no cumple

con las especificaciones descritas en la USP 44, NF 39, donde se establece que para el ensayo de valoración, el criterio de aceptación para Clorhidrato de Propranolol en tabletas debe encontrarse entre 90,0-110,0 % del contenido declarado. El Producto Nacional cumple con el contenido declarado, ya que se determinó que posee 96,95% ± 0,08% (alrededor de 38 mg de Clorhidrato de Propranolol/tab), mientras

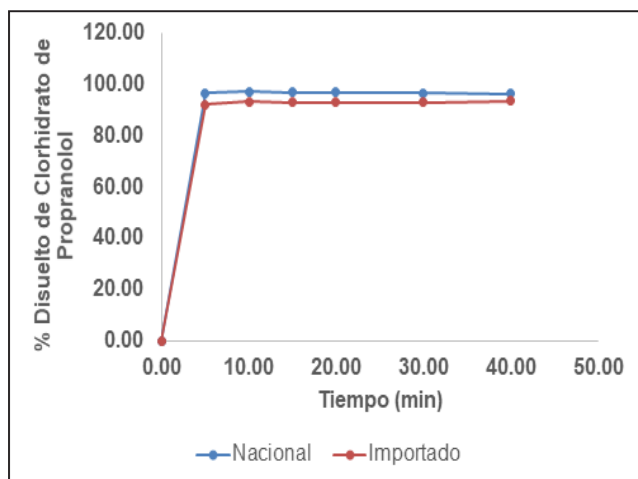


Figura 1. Perfil de disolución de tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg en Medio HCl 0,1N pH 1,2

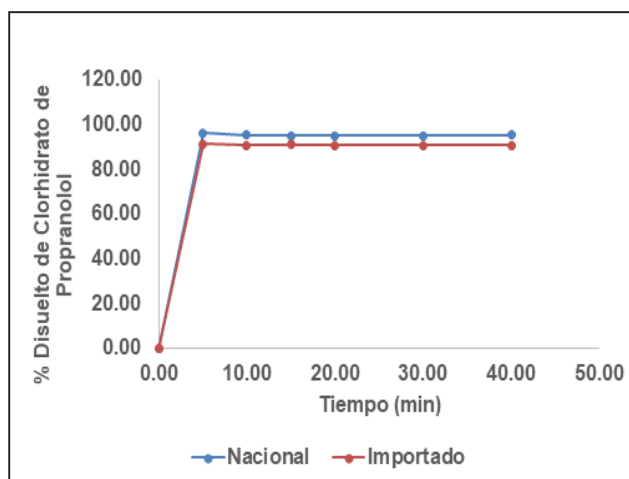


Figura 2. Perfil de Disolución de tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg en Medio Buffer Acetato pH 4,5

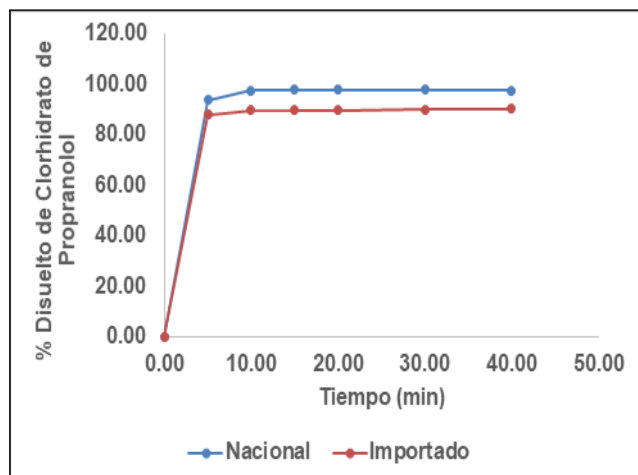


Figura 3. Perfil de Disolución de tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg en Medio Buffer Fosfato pH 6,8

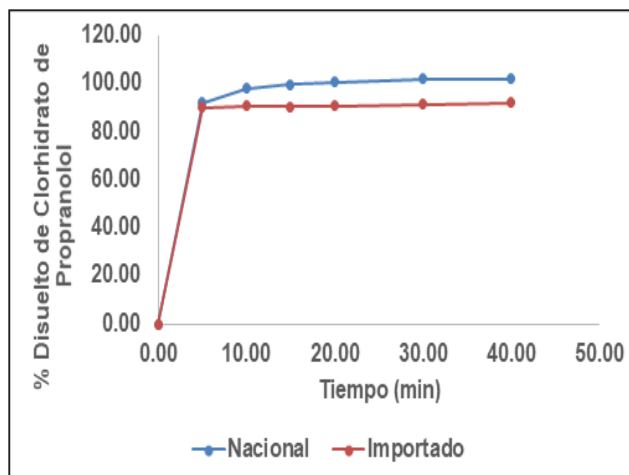


Figura 4. Perfil de Disolución de tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg en Medio Agua desionizada

que, en el Producto Importado, se determinó que posee $84,88\% \pm 0,36\%$ (alrededor de 33 mg de Clorhidrato de Propranolol/tab), lo que indica que la cantidad de principio activo por tableta en promedio es menor a la cantidad declarada.

Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Parra Poma (2022) en Perú quienes estudiaron la biodisponibilidad y bioequivalencia *in vitro* de las tabletas de Clorhidrato de propranolol de 40 mg importadas al Perú. Para los análisis de bioequivalencia *in vitro* estudiaron los

perfiles de disolución en tres medios de pH 1,2; pH 4,5 y pH 6,8, con puntos de muestreo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 minutos, demostrando que, no existe diferencias significativas entre medicamentos. Al calcular el comportamiento de las curvas usando los coeficientes de diferencia (f_1) y los coeficientes de similitud (f_2), demostraron que los diferentes lotes se encuentran dentro de las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos, concluyendo que el medicamento multifuente y el innovador tienen perfiles de disolución similares y aseguran su equivalencia terapéutica.

Tabla IV.

Datos obtenidos en la Determinación de Uniformidad de Contenido de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg; Nacional

N de Muestra	Absorbancia	Contenido Clorhidrato de Propranolol / tab (%)		
1	0,809	100,20		
2	0,854	105,80		
3	0,811	100,50		
4	0,808	100,10		
5	0,861	106,70		
6	0,853	105,70		
7	0,843	104,40		
8	0,838	103,80		
9	0,802	99,35		
10	0,786	97,37		
Promedio		102,392	≥ 101,5%	
DE		3,2531		
DER		3,18		
AV		8,6994	≤ L1: 15,0	Conforme

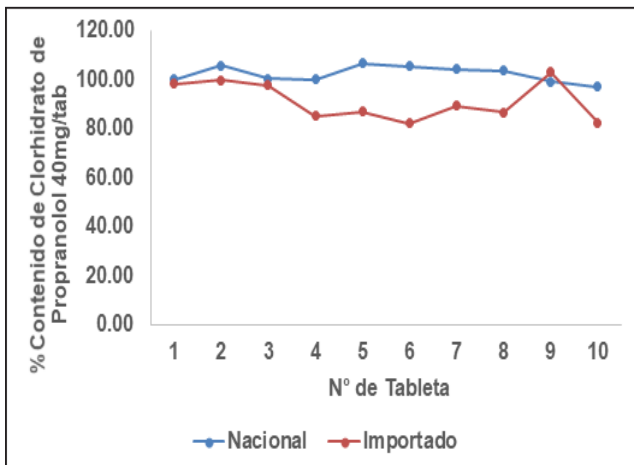


Figura 5. Uniformidad de Contenido de las Muestras de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg Producto: Nacional e Importado

Por otro lado nuestros hallazgos no están en línea con los reportados por Galván López y col. (1995) en un estudio comparativo de la cinética de disolución del clorhidrato de

propranolol en forma de tabletas de 40 mg para cuatro marcas del mercado nacional de Colombia, donde demuestran que hay diferencias significativas entre los tiempos de disolución del principio activo para las formas farmacéuticas estudiadas.

Conclusiones

Se observa que, para ambos medicamentos, los perfiles de disolución frente a los diferentes medios empleados son similares, ya que no existe diferencia significativa entre ellos. Por lo tanto, cumplen con las especificaciones establecidas.

En la prueba de Uniformidad de Contenido según el apartado <905> de la USP, se encontró que las tabletas del Producto Genérico Nacional cumplen con el ensayo,

Tabla V.

Datos obtenidos en la Determinación de Uniformidad de Contenido de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg: Importado

N de Muestra	Absorbancia	Contenido Clorhidrato de Propranolol / tab (%)		
1	0,814	98,45		
2	0,826	99,91		
3	0,808	97,73		
4	0,705	85,27		
5	0,720	87,09		
6	0,681	82,37		
7	0,740	89,50		
8	0,717	86,72		
9	0,853	103,20		
10	0,684	82,73		
	Promedio	91,297	≤ 98,5%	
	DE	7,7439		
	DER	8,48		
	AV	26,5625	≥ L1: 15,0	No Conforme

Tabla VI.

Resultados de Uniformidad de Contenido de las Muestras de Tabletas de Clorhidrato de Propranolol 40 mg Producto: Nacional e Importado

Parámetro	Especificaciones	Resultado*	
		Producto Nacional	Producto Importado
Numero de réplicas		10	
Promedio Contenido/ tab (%)	N/A	102,39	91,30
DER (%)	N/A	3,18	8,48
AV	AV < L1=15,00	8,70	26,56
Criterio de Aceptación	Cumplimiento de las especificaciones	0	No Conforme

mientras que el Producto Importado no lo cumple, esto debido a que existen variabilidad del contenido de Clorhidrato de Propranolol presente en las tabletas, en el que se observan tabletas con un

contenido que se encuentra por debajo del límite inferior, evidenciándose que por cada unidad de dosificación existen tabletas que no contienen la cantidad de principio activo declarada, esto representa

un gran problema de Calidad y Seguridad del Producto, ya que no se puede garantizar que ejerza el efecto terapéutico esperado.

En función a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la determinación del Factor de diferencia (f_1) y el Factor de Similitud (f_2) no garantiza la intercambiabilidad de un Producto Farmacéutico, es necesario realizar todos los ensayos correspondientes para demostrar su Calidad y Seguridad.

Se concluye que estos productos no pueden ser intercambiables, porque no se garantiza que el principio activo presente en el Producto Importado alcanzará las concentraciones plasmáticas requeridas para ejercer su función.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Análisis de Medicamentos "Dr. Carlos Ruiz Alonso", a la Fundación María Paula Alonso de Ruiz. Martínez, a la Dra. Marisabel Bor por ser nuestra guía y por su compañía, y a todas aquellas personas que de una u otra manera aportaron para que el trabajo se realizara.

Conflicto de interés

Las autoras declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

Al-Majed AA, Bakheit AHH, Abdel Aziz HA, Alajmi FM, AlRabiah H. 2017. Propranolol. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol 42:287-338

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug

product dissolution and *in vivo* bioavailability. Pharm Res 12(3):413-20.

Cid E. 1981. Cinética de disolución de medicamentos. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Monografía No. 24. Washintong D.C. OEA.

FDA. 2024. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) M13A Bioequivalence for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Guidance for Industry. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/165049/download>

Galván López H, Sierra MN, Garay Gómez M, Ramírez Prieto N. 1995. Estudio comparativo de la cinética de disolución del clorhidrato de propranolol en forma de tabletas de 40 mg para cuatro marcas del mercado nacional. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 24:1-6.

Goodman & Gilman's. 1996, The Pharmacological Basis of Therapeutics. By: Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker. by McGraw-Hill Companies.

Jung Cook H, de Anda Jáuregui G, Rubio Carrasco K, Mayet Cruz L. 2012. Comparación de perfiles de disolución. Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f_2 . Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 43(3): 67-71.

Katzung Bertram G, Trevor Anthony J. (Eds.). 2017. Farmacología básica y clínica. 13 Porto Alegre: McGraw-Hill,

OMS. 2023b. Hypertension Venezuela (Bolivarian Republic of) 2023 country profile, World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int/publications/m/item/hypertension-ven-2023-country-profile>

Parra Poma CM. 2022. Estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vitro* de tabletas de Clorhidrato de Propranolol de 40 mg. Importados al País y comparada Frente al Producto Innovador. Tesis Universidad Mayor de San Andrés.

Ciudad de La Paz - Estado Plurinacional de Bolivia. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/32511>

USP 44 NF 39. 2021. United State Pharmacopeia 44 - NF 39.

World Health Organization. OMS. 2023a. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/19-09-2023-first-who-report-details-devastating-impact-of-hypertension-and-ways-to-stopit#:~:text=Seq%C3%BAn%20el%20 informe%2C%20aproximadamente%20cuatro,adultos%20en%20todo%20el%20mundo.>



Educación en Bioética: Orígenes y evolución histórica

Bioethics Education: Origins and Historical Evolution

MARÍA MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN^{*.1}, MARITZA PADRÓN-NIEVES^{**2}

Resumen

La Bioética ha venido incorporándose lentamente en el quehacer de los profesionales de la salud; sin embargo, muchos piensan que las carreras en pregrado y postgrado carecen de una asignatura formal que permita asegurar la formación en los diferentes temas relacionados con la Bioética. Esto sucede en Venezuela y en algunos países, sobre todo en países en desarrollo. En las últimas décadas, debido al avance tecnológico y a la globalización, se ha hecho necesario plantear nuevos modelos políticos y educativos; de allí la recomendación de incorporar la Bioética en los programas de estudio en todos sus niveles, dándole importancia en diferentes ámbitos de la vida, y no solo en el área médica. En este sentido, se están haciendo esfuerzos, mientras surgen motivaciones como este artículo, para dar un aporte en la formación de estos profesionales. Se presenta información sobre la enseñanza a nivel internacional y nacional y de los orígenes de la Bioética.

Palabras clave: Bioética, educación en Bioética, profesionales de la salud

Abstract

Bioethics has been slowly incorporated into health professional activities; however, in many schools' curricula, both in undergraduate and graduate studies, there are no formal courses in Bioethics incorporated in the programmes, allowing a formal education in Bioethics. This happens in Venezuela and many other countries, especially in developing countries. In the last decades, however, due to technological advances and globalization, it has become necessary to discuss new political and educational models and, from there, the recommendations of incorporating Bioethics in the study programs at all educational levels, giving importance to it in different life environments and not only in the medical area. In this sense, efforts have been made, and some motivations, like this article, support professional education. National and international information about Bioethics origins is presented.

Keywords: Bioethics, bioethics education, health professionals

*Dra. en Farmacología. Profesor Titular de la Facultad de Farmacia, UCV, Miembro del Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas. **Dra. en Farmacología. Profesor Titular de la Facultad de Medicina, UCV. Miembro del Centro Nacional de Bioética (CENABI). Correspondencia: mapa2111@gmail.com

Orcid: [10000-0002-4439-9856](https://orcid.org/0000-0002-4439-9856)

[20000-0001-5333-8097](https://orcid.org/0000-0001-5333-8097)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.12](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.12)

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

Recepción: 11/11/2024

Aprobación: 18/11/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 257-264. 2024

Introducción

El avance biotecnológico ha enfrentado al hombre a situaciones nunca planteadas de manera que el conocimiento de la Bioética como una forma de reflexión de la condición del ser humano y la preservación de la vida y su entorno es imprescindible para estar a la par del desarrollo avasallante que ha ocurrido en áreas inherentes a las ciencias de la salud. Se necesita, entonces, una reflexión multi, inter y transdisciplinaria para lo cual se debe tener un basamento idóneo.

La Bioética, derivada de la ética, ha aportado los principios para la comprensión de la relación del ser humano respecto a la vida en el planeta, así como al ambiente en el que se generan las condiciones mínimas para su desarrollo. De manera que estudia las cuestiones éticas acerca de la vida que surgen en las relaciones entre la biología, la nutrición, la medicina, la química, la política, el derecho, la filosofía, la sociología, la antropología, la teología, la ecología, entre otras ciencias y disciplinas.

Una de las definiciones de Bioética la describe como el estudio transdisciplinario orientado a la toma de decisiones éticas en los problemas planteados por los progresos biológicos en el área de salud, tanto a nivel micro como macrosocial, y su repercusión en la sociedad y en su sistema de valores (Abel, 2013). De manera que desde hace casi 50 años esta disciplina ha estado inmersa en muchas actividades que realiza el profesional del área de la salud (Castillo Valery, 2006). En forma resumida, se dice que la Bioética o ética de la vida puede ser considerada como la ciencia de la moral aplicada a las ciencias de la vida.

En otros países, la Bioética es un componente humanístico no solo en la educación superior, sino también a nivel básico y medio. Es considerada un componente indispensable en los programas de pre y postgrado, principalmente en carreras del área de la salud ya que su carácter multi, inter y transdisciplinario permite una visión amplia sobre los temas y problemas complejos del mundo actual y promueve en los estudiantes valores y actitudes positivas para la búsqueda de soluciones en el marco de sus respectivas futuras profesiones (Castillo Valery, 2006).

En Venezuela se están realizando esfuerzos para incorporar la Bioética en los pensa de estudio; sin embargo, hay mucha tarea por hacer. Es por esto que la motivación principal de esta publicación es tratar de dar un aporte a las carencias existentes en la enseñanza de la Bioética en nuestro país. En este sentido, un artículo publicado este mismo año (Salazar-Bookaman, 2024) planteó aspectos tales como: ética y Bioética, la ética médica, ¿por qué estudiar Bioética?, los principios de la Bioética, aspectos bioéticos de la investigación en seres humanos y el Consentimiento Informado, que sirven de base para los aspectos tratados en esta publicación.

Orígenes de la Bioética

Históricamente, la Bioética surge ante situaciones irregulares como, por ejemplo, los experimentos donde no se respetaba la dignidad humana, tales como el caso de Tuskegee en Alabama (Estados Unidos),

en 1932, en el que estudiaron el curso natural de la sífilis al monitorizar el progreso de la salud de 600 hombres, todos afroamericanos y prácticamente analfabetos, o el caso Willowbrook entre 1950 y 1970, en el que se realizaron experimentos en un grupo de niños discapacitados que estudiaban con régimen de internado, en la Escuela Estatal de Willowbrook en Nueva York, para estudiar la hepatitis A y B; así como los experimentos realizados en los campos de concentración nazi durante la Segunda Guerra Mundial, o los procedimientos clínicos sin informar adecuadamente al paciente acerca de los tratamientos a los cuales serían sometidos (Siurana Aparisi, 2010). Aunque la Bioética surge posteriormente a estos eventos es importante conocer su evolución.

El término Bioética data de 1927, cuando apareció en el editorial publicado por el educador alemán Fritz Jahr (1895-1953) en la revista científica "Kosmos" (Sass, 2011). Sin embargo, la partida oficial del nacimiento de la Bioética se ubica en 1970 con su fundador el oncólogo holandés Van Rensselaer Potter (Potter, 1998), quien escribió sobre la importancia de construir puentes entre el humanismo y la ciencia, en pro del beneficio futuro del hombre.

Para Ciccone (2006) la Bioética tiene sus orígenes en los valores morales, la vida, la salud como tópicos de interés de larga data. Es por esto, que en sus inicios fue terreno casi exclusivo de la teología moral de la Iglesia Católica y también de otras disciplinas como la deontología médica y la medicina legal. Llano (2001) publicó un recuento histórico de las personalidades e instituciones más importantes que forjaron esta nueva ética, a saber: a) El jesuita francés Teilhard de Chardin, quien inspiró

a Potter en muchas de sus ideas; b) El teólogo católico Daniel Callaghan, que creó en 1969 el Centro de Bioética "Hastings Center"; c) Los Jesuitas en la Universidad de Georgetown en Washington que crearon en 1971 el Instituto Kennedy de Ética; d) El Centro de Bioética del Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal, Canadá, creado en 1979 por la Universidad Católica de Laval; e) Los trabajos publicados por la Pontificia Comisión para la Pastoral de los Profesionales de la Salud en 1985; f) El Jesuita Francisco Abel quien en 1986 fundó el Instituto Borja de Bioética en Catalunya, España; y g) El Congreso Internacional sobre Bioética organizado por la Santa Sede en 1987. Todas estas instituciones y actividades están orientadas a lo que se conoce como la Bioética Clínica.

Por otro lado, debido a una serie de eventos históricos como la Segunda Guerra Mundial, donde los derechos humanos fueron vulnerados en el área de investigación, se publicaron documentos de los cuales cabe mencionar:

El Código de Nuremberg (1946), que fue la consecuencia de los hechos violatorios de la dignidad humana cometidos por los científicos nazis. Este código es el marco de referencia para hacer que sea cumplido en toda experimentación con seres humanos: (1) el dar un consentimiento voluntario, (2) ser realizada para beneficio de la sociedad, (3) sin sufrimiento físico y mental innecesario, (4) protección al individuo de cualquier posibilidad de muerte o incapacitación, (5) no deben vulnerar a la condición humana, (6) debe ser realizado por personal científico calificado y (7) la persona tiene el derecho de retirarse de la investigación en cualquier momento si así lo desea.

Más adelante, en 1948, la Asamblea de la Asociación Médica Mundial, redactó la Declaración de Ginebra, también denominada el "Juramento de Fidelidad Profesional" y cuyo propósito fue la revitalización de la ética del juramento hipocrático. Ese mismo año, la Asamblea General de las Naciones Unidas promulgó la Declaración de los Derechos Universales del Hombre, en cuyos fundamentos destaca: el respeto a la dignidad del ser humano, la prohibición de no ser sometidos a torturas, el derecho a la igualdad de todos, el derecho a la salud y el bienestar, el reconocimiento de la personalidad jurídica de todo ser humano, entre otros.

La Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial presentada en el año 1964 contiene los principios éticos que deben regir las investigaciones médicas en seres humanos, siendo los más importantes: el respeto por el individuo, el derecho a la autodeterminación de los seres humanos y el derecho a optar por decisiones informadas. Este último, será crucial para la Bioética y es el denominado Consentimiento Informado.

En los Estados Unidos de Norteamérica en 1979, el Departamento de Salud, Educación y Bienestar presentó el Informe Belmont sobre los principios éticos y las pautas que deben estar presentes en todo proyecto de investigación para la protección de los seres humanos. Este informe significó un gran respaldo a la incipiente Bioética. Entre los principios que recomienda el Informe Belmont están, el respeto a las personas, el derecho a la autonomía de todos y cuando esta condición este disminuida, el individuo debe ser protegido. También, se contempla la Beneficencia o no causar ningún daño,

la maximización de los beneficios posibles y la disminución de los daños al participar en experimentos. Como tercer principio, la Justicia o la distribución justa de cargas y beneficios, basadas en que cada persona debe recibir de acuerdo con su necesidad, su propio esfuerzo, su contribución a la sociedad o según su mérito (Salazar-Bookaman, 2024).

Otro hito importante para el impulso de la Bioética fue la Declaración Universal de Bioética y Derechos Humanos promulgada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) en 2005.

Por su parte, el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas CIOMS, es una organización internacional no gubernamental que mantiene relaciones oficiales con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estas organizaciones, en conjunto, publicaron las Pautas CIOMS (2002) para los países de América Latina, con el objetivo de facilitar la aplicación de la Declaración de Helsinki en los países en desarrollo. Estas pautas se actualizaron en el 2016 (Vera y col., 2020; Casbarro y col., 2020; Saraiba y col., 2020). Este documento resalta el uso del Consentimiento Informado e incorpora los conceptos de poblaciones vulnerables, da recomendaciones sobre el uso de placebo y la necesidad de compensación por daños a los sujetos de investigación.

La Declaración de Helsinki tiene 8 versiones, ya que es revisada en función de los avances tecnológicos en el área de la salud. La versión más reciente fue adoptada por la 75ª Asamblea General, realizada en la misma ciudad de Helsinki, Finlandia, en octubre de 2024.

Con base en estas normativas internacionales, se elaboraron en el país los siguientes documentos: el Código de Bioética y Bioseguridad de la Comisión de Ética, Bioética y Biodiversidad del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y la Tecnología en su 3º edición del 2010 y que fue denominado Código de Ética para la Vida; el Reglamento de Investigaciones Clínicas del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (2000); la Ley del Medicamento aprobada en el 2000 y la Ley Orgánica de Ciencia, Tecnología e Innovación (2010).

Estos documentos sirven de base para la aplicación de la Bioética en diferentes ámbitos: incluyendo el académico y el de investigación, por esto se hace necesario la formación Bioética de en todos los niveles de educación.

Enseñanza de la Bioética

La enseñanza de la Bioética se inició en las carreras médicas a partir de los años setenta en los Estados Unidos de América y en Canadá. Hoy, es parte de las asignaturas de todas las escuelas médicas de esos países. Posteriormente, España, de tradición deontológica, se unió con éxito a las ideas norteamericanas y luego, promovió la llegada de la Bioética a América Latina (Gracia Guillen, 2004). Cabe destacar que desde 1993, el Programa Regional de Bioética de la OPS/OMS apoya la integración sistemática de la ética en las distintas áreas del trabajo de la salud y la UNESCO ha desarrollado, a nivel mundial y para América Latina, un curso en la modalidad virtual con duración de un año donde concurren profesionales de diversas áreas. Realizó dos cursos anuales desde 2006 y hasta el año 2021.

En América Latina y el Caribe se perfila una Bioética diferente a la estadounidense y a la europea, ya que presenta carácter social, por los problemas de justicia, autonomía y responsabilidad profesional planteados en los sistemas de salud, la protección del ambiente y el progreso científico. A su vez, se dirige al debate sobre los principios y valores, relativos a la cultura y el desarrollo social de cada país (Schmidt, 2007). Países como Chile, Argentina, Brasil y Colombia, han promovido este debate como una necesidad de reflexionar sobre situaciones de índole social como la pobreza, el embarazo precoz, desplazamientos, entre otras situaciones.

Enseñanza de la Bioética en Venezuela

Bello Atencio y Maya (2013) refieren la incorporación de la Bioética en la legislación venezolana con base a los lineamientos de la Declaración Mundial de Educación Superior (UNESCO,1998), incorpora en la Carta Magna a la educación como un Derecho Humano y posteriormente concatenada con la Declaración sobre Bioética y Derechos Humanos se promulga la Ley Orgánica de Educación en el año 2009, en la cual se incorpora por primera vez en la historia legislativa del país la Bioética como principio rector de la educación universitaria en su artículo 33.

En Venezuela, Schmidt (2007) dividió el desarrollo de la Bioética en tres etapas. La primera a inicios de los años 80, cuando se introduce como una Ética de la Medicina. Se da a conocer como Bioética Clínica en las escuelas de Medicina y se incorporó en la Ley de Ejercicio de la Medicina del 1982, actualizada en el 2011 y en el Código de Deontología Médica del 1983, acualizado

en el 2013. Cada uno contiene un capítulo sobre la investigación en seres humanos. Estos documentos, aun hoy en día, sirven de referentes para todos los profesionales de la salud.

A partir de los años 90, se inicia la segunda etapa donde la Bioética comienza a incursionar en el marco sociológico, jurídico, filosófico, teológico y de ingeniería, permitiendo que sea comprendida de forma multidisciplinaria e interdisciplinaria. En 1998, se aprobó un proyecto de Ley Orgánica de Salud, en el que se incluyó aspectos de los Comités de Bioética y de la creación de una Comisión Nacional de Bioética. A finales de los 90, inicia la última etapa, que está en pleno proceso, donde la Bioética comenzó a ser considerada como un eje transversal de la formación en el área de la salud, juntamente con la comunicación, la investigación, el trabajo en equipo y la ciudadanía. Por otra parte, se incentiva la conformación de Comités de Ética en diferentes instituciones de salud y de educación. Sin embargo, no se ha acompañado del desarrollo de la enseñanza de la Bioética en todos los niveles de educación. Las universidades han sido quienes comenzaron a promoverla en pregrados y postgrados; en el caso de la Universidad Central de Venezuela, en las Facultades de Ciencias, Medicina, Ciencias Jurídicas y Políticas, Humanidades y Educación, Odontología, Farmacia y Ciencias Veterinarias, donde se ha iniciado la incorporación de la Bioética en las actividades docentes.

El Centro Nacional de Bioética (CENABI) fundado en 1996 por la Comisión de Estudios para Graduados en la Facultad de Medicina de la UCV, como una Asociación Civil sin fines de lucro, ha trabajado desde

entonces llevando conocimientos sobre Bioética a diferentes niveles profesionales en el territorio nacional con 32 Cursos de Ampliación con más de 700 egresados y desde el año 2010 ofrece una Maestría en Bioética Global con el aval de la UCV que está por iniciar la décima cohorte.

Recientemente, el Consejo de Facultad de Medicina aprobó la incorporación de un curso de Bioética en los postgrados de dicha facultad en sus diferentes sedes. El curso consta de: Aspectos fundamentales de la Bioética, Bioética de las Relaciones Sanitarias, Marco Ético-Legal del ejercicio de la Medicina, Bioética del Inicio y del Final de la Vida Humana, Justicia Sanitaria y Bioética de la Investigación Biomédica.

La función de las universidades nacionales se puede resumir de la siguiente manera: la Universidad de Carabobo incluyó Bioética en su currículo del pregrado médico en 1990, la Universidad Experimental Francisco de Miranda incluyó esta asignatura en su pensum en 1993 y más recientemente han hecho lo propio la Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado en el 2005 y la Universidad de Los Andes, que lo hace en el 2006. En la Universidad del Zulia, hay evidencia de la enseñanza de ética y Bioética en sus escuelas de Medicina y de Odontología constituyendo en esta última un eje transversal de enseñanza, esto es, la incorporación de al menos una unidad de Bioética en cada asignatura UNFM, 1993, Malpica, 2005, Montilva y col., 2008, Universidad de Los Andes, ULA 2008, Bello y col., 2013).

Podemos concluir que la función de las universidades es la formación académica y educación moral de los profesionales, a nivel de pre y postgrado, por lo que debe

incorporar a la enseñanza de la investigación científica e innovación tecnológica los elementos de la Bioética que les permitan participar en el debate contemporáneo y cumplir a plenitud sus obligaciones y responsabilidades sociales.

Se puede aseverar que todo profesional que persiga la excelencia no sólo debe estar actualizado en los aspectos técnicos y legales, sino que, además, debe incorporar la reflexión Bioética en el ejercicio diario, para lo cual la educación en esta área es esencial.

Referencias Bibliograficas

- Abel F. 2003. El triple reto de las nuevas tecnologías (antropológico, ético, teológico). *Rev Lat Bioética* 5:170-251.
- Asociación Médica Mundial. Declaración de Ginebra. 1948, enmendada por la 22a Asamblea. Sydney, Australia. 1968.
- Asociación Médica Mundial. 1964. Declaración de Helsinki. Adoptada y proclamada por la 18ª Asamblea. Helsinki, Finlandia. Actualizada en 2024. Disponible en: [jama_2024_sc_240016_1729349326.39173%20\(1\).pdf](http://jama_2024_sc_240016_1729349326.39173%20(1).pdf).
- Bello Atencio M, Maya F. 2013. Algunos aspectos de la bioética en la educación superior venezolana. REDHECS, 15° ed. Disponible en <http://publicaciones.urbe.edu/index.php/REDHECS/article/2562/3890>.
- Bello Bracho S, Urdaneta García M, Bracho Faria C, Weir Cuenca LA, Ferrer Carrizo DB. 2013. La bioética como Eje Transversal en el Pensum de Estudio de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia-Venezuela. *Acta Odontologica Venezolana* 51(1):
- Castillo Valery A. 2006. Bioética. Ed. Disinlimed. Caracas.
- Ciccone L. 2006. Bioética. Historia. Principios. Cuestiones. 2a ed. Madrid: Ediciones Palabra.
- Código de Ética en Medicina. 2003. CXXXIX Región Extraordinaria de la Federación Médica Venezolana. Barquisimeto.
- Código de ética para la vida. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. 3° ed. 2010.
- Código de Nuremberg de 1946. Centro de documentación de bioética. Departamento de Humanidades Biomédicas. Universidad de Navarra. Disponible en: <http://www.unav.es/cdb/intnuremberg.html>.
- Comisión nacional para la protección de los sujetos humanos de investigación biomédica y del comportamiento. 1979. Informe Belmont. Principios y guías éticos para la protección de los sujetos humanos de investigación. Disponible en: <http://www.pcb.ub.edu/bioeticaidret/archivos/norm/InformeBelmont.pdf>.
- Conferencia Mundial sobre la Educación Superior en el siglo XXI: Visión y acción. Paris 1998. Disponible en: https://unesdoc.unesco.org/ark:/482223/pf0000113878_spa.
- Segunda Guerra Mundial en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos. Disponible en: cioms.ch/wp-content/uploads/2018/01/CIOMS-EthicalGuideline_SP_WEB.pdf.
- Gracia Guillen D. 2004. Planteamiento general de la bioética. En: Gracia D. Ed. Fundamentación y enseñanza de la bioética. Editorial El Búho. Santa Fe de Bogotá p.11-28.
- Llano A. 2001. ¿Qué es bioética? En: Ética en medicina. Fundamentación. Módulo 1. Centro Nacional de Bioética. Caracas: Universidad Central de Venezuela. p. 57-77.
- Malpica CC. 2005. Reflexiones sobre el Problema de la Enseñanza y Aprendizaje de la Bioética como Método para Comprender la Medicina Compleja. *Rev. Educación en Valores* 1(3):1-13.
- Montilva M, Zapata E, Papale J, Santander F. 2008. Enseñanza de la Bioética en Decanato de Ciencias de la Salud de la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Experiencias de un proceso en desarrollo. II Congreso Venezolano e Iberoamericano de Bioética. 29 de julio-1° de agosto. Caracas.
- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) Declaración Universal de Bioética y Derechos Humanos Resolución 217 A (III), de 10 de diciembre de 1948.
- Organización de las Naciones Unidas. Declaración Universal de los Derechos Humanos. Adoptada y proclamada por la 183ª Asamblea General de la. 10 de diciembre de 1948.
- Potter VR. 1988. Global bioethics. Building on the Leopold legacy. Michigan: Michigan State

- University Press.
- Programa de Bioética en Medicina. Universidad de Los Andes. Núcleo Táchira 2008. Disponible en <http://www.ula.ve>.
- Programa de Educación Permanente en Bioética. Red bioética UNESCO Curso on line de Bioética Clínica. Disponible en: <http://www.redbioetica-edu.com.ar>.
- Programa Regional de Bioética - OPS/OMS Organización Panamericana de la Salud. Disponiible en: www.paho.org.
- Reglamento de Investigación en Farmacología Clínica. 2000. Normas de Junta Revisora de Productos Farmacéuticos. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Informe Médico 2(3):205-20.
- República Bolivariana de Venezuela. Ley de Medicamentos. Gaceta Oficial (Nº 37006) del 03 de agosto de 2000. Caracas.
- República Bolivariana de Venezuela. Ley del Ejercicio de la Medicina. Gaceta Oficial Nº 39.823 del 19 de diciembre del 2011. Caracas.
- República Bolivariana de Venezuela. Ley orgánica de Ciencia y Tecnología. Gaceta Oficial Nº 39775 del 16 de diciembre de 2010. Caracas.
- República Bolivariana de Venezuela. Ley Orgánica de Educación. Gaceta Oficial Nº 37.006 del 03 de agosto de 2000. Caracas.
- República Bolivariana de Venezuela. Ley Orgánica de Salud. Gaceta Oficial Nº 36.578 del 11 de noviembre de 1998. Caracas.
- Salazar-Bookaman MM. 2024. Bioética: Una visión general. Rev Fac Farmacia. 87(1y2): 126-140. 2024.
- Saraiba A, Sánchez S, Santos S, Alonso M, Colella M, Legón J, Trujillo I, Padrón-Nieves M. 2020. Análisis comparativo de las pautas del consejo de organizaciones internacionales de ciencias médicas (CIOMS) 2016 (Parte 3 de 3). Rev Digit Postgrado 9(3): e227.
- Sass H. 2011. El pensamiento bioético de Fritz Hajr 1927-1934. Aesthethica. Rev Internacional de Estudio e Investigación Interdisciplinaria sobre Subjetividad, Política y Arte 6 (2):20-33.
- Schmidt L. 2007. La bioética en Venezuela, primeras huellas. Bioethikos-Centro Universitario Sao Camilo 1(2):4-38. Disponible en: http://www.ula.ve/cdcht/cdcht/pdf/comite_etica/la_bioetica_en_venezuela.pdf
- Siurana Aparisi JC. 2010. Los principios de la bioética y el surgimiento de una bioética intercultural. Veritas 22:121-157.
- Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, Edo Falcón. Disponible en <http://www.unefm.edu.ve>.
- Vera Porrello L, Reyes R, J, Delgado Colmenares T, Echenagucia Echenagucia M, Padrón-Nieves M. 2020. Análisis comparativo de las pautas del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) 2016 (Parte 1 de 3). (e200). Rev Digit Postgrado 9(1).



Validación de un método analítico por HPLC en fase reversa para la determinación de Vitaminas B1 y B2 en cereales

Validation of an analytical method by HPLC in reverse phase for the determination of Vitamin B1 and B2 in cereals

GREILE D ORTIZ M^{1*}, ALICIA M RINCÓN C^{**}, LIZET Y BOU RACHED R^{2**}

Resumen

Introducción: La necesidad de evaluar el cumplimiento del Plan Nacional de enriquecimiento por parte de la Industria alimentaria, para así garantizar los nutrientes para la población venezolana, ha conducido a obtener métodos analíticos confiables, precisos, rápidos y validados. En el presente trabajo se optimizó y validó un método analítico por HPLC en fase reversa para la identificación y cuantificación de las vitaminas B1 y B2 en un producto de alto consumo de los venezolanos como es la harina de maíz precocida y enriquecida con esos micronutrientes. **Objetivo:** Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) para la determinación de vitaminas B1 (tiamina) y B2 (riboflavina) en cereales. **Materiales y métodos:** La muestra utilizada fue harina de maíz precocida, adquirida en un supermercado local en la ciudad de Caracas. Se usó el equipo HPLC, marca Waters, con una columna Symetry C18. El método inicial para la validación fue el establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 42 NF 37, sección de suplementos dietéticos y vitaminas hidrosolubles, ensayos para tiamina y riboflavina. **Resultados:** Se optimizó y validó el método por HPLC para determinar las vitaminas B1 y B2, verificando que el procedimiento cromatográfico genera resultados consistentes y fiables, con desviaciones estándar relativas menores al 2%. Los parámetros de linealidad, selectividad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación son conformes con los valores establecidos por las normas ISO. Se extrajeron las vitaminas en estudio en dos muestras de harinas comerciales de cereales enriquecidos, permitiendo comparar con lo declarado por el fabricante. **Conclusiones:** Se demostró que el método HPLC optimizado puede ser aplicado para el análisis de productos derivados de cereales enriquecidos. Proporcionó una linealidad y precisión comparables al método de referencia establecido por la USP. El método propuesto tiene la ventaja de determinar rápida y simultáneamente ambas vitaminas en una sola corrida cromatográfica, a una misma longitud de onda, en un tiempo total de 10 min.

Palabras clave: Validación, método analítico, HPLC, fase reversa, tiamina, riboflavina, harinas de cereales enriquecidas

Abstract

Introduction: The need to evaluate compliance with the National Enrichment Plan by the industry to guarantee nutrients for the Venezuelan population has led to the obtaining of reliable, precise, rapid, and validated analytical methods. In the present work, an analytical method by HPLC in reverse phase was optimized and validated for identifying and quantifying vitamins B1 and B2 in a product of high consumption by Venezuelans, such as precooked corn flour enriched with those micronutrients. **Objective:** Validate an analytical method by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of vitamins B1 (thiamine) and B2 (riboflavin) in cereals. **Materials and methods:** The sample used was precooked corn flour purchased at a local supermarket in Caracas. Waters HPLC equipment was used with a Symmetry C18 column. The initial method for validation was established by United States Pharmacopeia (USP) 42 NF 37, the section on dietary supplements and water-soluble vitamins, and assays for Thiamine and Riboflavin. **Results:** It was possible to optimize and validate the HPLC method applied to determine vitamins B1 and B2, verifying that the chromatographic procedure generates consistent and reliable results with relative standard deviations less than 2%. Parameters of linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limit, and quantification limit were obtained within the values established by ISO standards. The vitamins under study were extracted in two samples of enriched commercial cereal flours, allowing for a comparison with what was declared by the manufacturer. **Conclusions:** It was demonstrated that the optimized HPLC method can be applied to analyzing products derived from fortified cereals. It provided linearity and precision comparable to the reference method established by USP. The proposed method has the advantage of quickly and simultaneously determining both vitamins in a single chromatographic run at the same wavelength, with less time in the assay.

Keywords: Validation, analytical method, HPLC, reverse phase, thiamine, riboflavin, enriched cereal flours

*Mención Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. **Unidad de Investigación Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: lizetbourachedr@gmail.com

Orcid: [10009-0004-0474-6181](https://orcid.org/0009-0004-0474-6181)
[20009-0005-8951-0377](https://orcid.org/0009-0005-8951-0377)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.13](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.13)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 31/10/2024
Aprobación: 05/12/2024

Rev. Fac. Farmacia 87(3): 265-280. 2024

Introducción

Los cereales son considerados la principal fuente de alimentos a nivel mundial (FAO, 2002). Los productos a base de cereales, además de proporcionar energía, proteínas, vitaminas del grupo B y minerales como fósforo, potasio y magnesio, y compuestos bioactivos como lignanos son beneficiosos para la salud. Resultan económicos de producir, fáciles de almacenar y transportar, y mantienen su calidad por más tiempo si se conservan en un ambiente seco. Son plantas cultivadas principalmente por sus semillas comestibles altamente nutritivas, las cuales son comúnmente conocidas como granos.

El arroz, el maíz y el trigo representan aproximadamente el 60 % de la energía obtenida de los alimentos en todo el mundo, lo que los convierte en alimentos básicos para más de 7000 millones de personas (McKevith, 2004). En Venezuela, la harina de maíz precocida representa el principal alimento consumido por la población (Zambrano y Sosa, 2018), usada en la preparación de la arepa y otros productos similares; siendo esta la razón por la cual es seleccionada como vehículo ideal para el enriquecimiento con algunas vitaminas y minerales. La harina de maíz precocida (HMP) se obtiene industrialmente a partir del endospermo del grano de maíz, el cual ha sido desprovisto del germen y de la cutícula, proceso que se lleva a cabo por medio de la molienda húmeda. Este producto es considerado un alimento estratégico de producción centralizada y de consumo masivo, siendo el ingrediente principal de la popular arepa. Además, la HMP también es un elemento esencial en la elaboración de la tradicional hallaca navideña. En su forma original, la HMP

contiene pequeñas cantidades de vitaminas del complejo B, menos de 4 mg de hierro y ninguna actividad de vitamina A. Debido a estas características, la HMP se convierte en un vehículo ideal para enriquecerse con hierro y vitaminas, como la B1 y B2 (Gaceta oficial, 1992).

La molienda es el principal proceso tecnológico relacionado con los cereales. Existen diversas técnicas de molienda adaptadas a cada tipo de cereal, así como otros procesos como la extrusión y la fermentación que pueden ser utilizados en la elaboración de productos derivados de los cereales. Estos procesos, además de tener implicaciones técnicas, también modifican el contenido nutricional de los cereales. Muchos alimentos a base de cereales son sometidos a procesos de calor que pueden afectar la biodisponibilidad de minerales como hierro, calcio y zinc. Durante procesos de ebullición, se pueden perder alrededor del 40% de las vitaminas B, con mayores pérdidas en folato. Por otro lado, las pérdidas durante el horneado suelen ser menores, excepto en el caso del folato (McKevith, 2004).

La riboflavina (vitamina B2) funciona en conjunto con las otras vitaminas del complejo B. Es importante para el crecimiento corporal y la producción de glóbulos rojos. La tiamina (vitamina B1) ayuda a las células corporales a convertir los carbohidratos en energía (Martín, 2000). Estos dos compuestos son sensibles al calor, la luz y otros factores, ocasionando que los procesos tecnológicos en los granos de cereales puedan llegar a destruirlos parcialmente. Por tanto, muchos productos de cereales industriales son enriquecidos con vitaminas del grupo B para restablecer sus niveles adecuados.

Los alimentos ricos en tiamina incluyen el cerdo, las vísceras, levadura de cerveza, carnes magras, huevos, vegetales de hoja verde, cereales y legumbres. La deficiencia de tiamina puede ser causada por una ingesta inadecuada, aumento en la demanda de la vitamina, problemas de absorción o metabolismo, y el alcoholismo crónico (Pardo, 2004). La falta de esta vitamina en la dieta puede llevar a la aparición de Beriberi, una enfermedad que se manifiesta con síntomas como neuritis, atrofia muscular, falta de coordinación y, en casos graves, parálisis. La muerte generalmente se produce por falla cardíaca (Fernández y col., 2013).

La riboflavina es una vitamina que juega un papel crucial en la oxidación tisular y en la liberación de energía de los alimentos (Pérez Ríos y Ruano, 2004). Se encuentra en alimentos como la leche, carne, pescado, hortalizas verdes y huevos. Es una sustancia cristalina de color amarillo que resulta ser mucho menos soluble en agua y más resistente al calor que la tiamina. La falta de vitamina B2, también conocida como arriboflavinosis, se caracteriza por la presencia de síntomas en la piel, mucosas, ojos y sistema nervioso. Algunos de estos síntomas incluyen lesiones en la piel, úlceras en la comisura de los labios, fotofobia, cataratas, úlceras en la córnea y problemas nerviosos. Es importante destacar que la deficiencia de vitamina B2 suele ser más común en personas que consumen cantidades insuficientes de alimentos ricos en esta vitamina, como los bebedores, fumadores y vegetarianos estrictos. Por lo tanto, es importante asegurarse de incluir fuentes de riboflavina en la dieta diaria para prevenir su carencia y los síntomas asociados (Pérez y Ruano, 2004).

Para contrarrestar las pérdidas durante el procesamiento de los cereales y sus derivados, además de ser una estrategia nutricional, en varios países se han implementado medidas de restauración (añadido de nutrientes perdidos durante el proceso tecnológico), fortificación (añadido de nutrientes no naturalmente presentes en alimentos o presente en cantidades muy pequeñas) o enriquecimientos (mejoramiento del valor nutritivo de un alimento mediante el agregado de nutrientes); según sea el caso, para los cereales y sus derivados (COVENIN, 1997). En Venezuela se dictó una medida para compensar la deficiencia de vitaminas en la población (Chávez, 2020). Así, mediante el Decreto 2.492 del año 1992, se estableció en su Artículo 6 (Gaceta Oficial, 1992), la fórmula presentada por el Instituto Nacional de Nutrición (INN) para enriquecer 1 kg de harina de maíz precocida, convirtiéndose en un requisito obligatorio, con el fin de compensar la carencia de vitaminas en la población y prevenir consecuencias graves en la salud, como retraso en el desarrollo mental y mayor riesgo de infecciones (Scrimshaw, 2005). Es importante resaltar que el Decreto también establece que esta fórmula de enriquecimiento sea ajustada de acuerdo con los criterios de las Normas Venezolanas COVENIN. El perfil de enriquecimiento de la Norma Venezolana COVENIN para harina de maíz precocida (COVENIN, 1996), incluye vitaminas y minerales como vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina y hierro, de carácter obligatorio por 100 g: vitamina A 270 ER (900 UI); tiamina 0,31 mg; riboflavina 0,25 mg; niacina 5,1 mg y hierro 5,0 mg, para toda la HMP producida y comercializada en Venezuela. Por tanto, es crucial que en la industria, entes regulatorios y laboratorios

acreditados por la Contraloría Sanitaria realicen evaluaciones de los componentes nutricionales de este alimento para garantizar el cumplimiento de los valores establecidos.

Tanto la vitamina B1 como la B2 pueden ser fácilmente cuantificadas en productos farmacéuticos a través de métodos HPLC-UV. Varios autores, han sugerido a la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) como técnica de separación para detectar y cuantificar la tiamina y riboflavina (Rodríguez y col., 2011; Trinidad, 2020). A pesar de esto, cada método analítico propuesto que utilice equipos distintos debe ser validado para garantizar su desempeño de acuerdo con los requisitos establecidos para este propósito (PAHO, 2008).

Se han propuesto varios métodos analíticos para determinar tiamina y riboflavina, dependiendo de la precisión y sensibilidad requeridas, así como de posibles interferencias en la muestra. En productos farmacéuticos, se pueden cuantificar fácilmente mediante técnicas de HPLC-UV, pero en alimentos se necesitan métodos más específicos debido a las interferencias y diferentes matrices (Lynch, 2000). El análisis espectrofluorométrico es sensible y recomendado para alimentos, ya sea directamente o acoplado a HPLC (AOAC, 2011). Se prefieren columnas C18 en HPLC de fase inversa, pero también se pueden usar columnas de intercambio iónico. El uso de soluciones tampón (buffers) y reactivo de par iónico mejora la resolución de picos y condiciones reproducibles.

Rodríguez y col. (2011), desarrollaron un método para la determinación de tiamina y riboflavina en productos comerciales de cereales complejos utilizando UV-HPLC

Isocrático. Se utilizó una columna C18 con detección UV a 268 nm y reactivos de pares iónicos para la separación de las vitaminas. Se comparó con el método de referencia de la AOAC y se demostró que el método propuesto es menos sensible pero más preciso, con una rápida determinación simultánea de ambas vitaminas en una sola corrida cromatográfica. El método también permite un menor tiempo empleado y un menor uso de reactivos, con un costo inferior. Vizúete (2015) validó una técnica analítica por HPLC para la cuantificación de vitamina B1 en harina de trigo fortificada mediante hidrólisis y oxidación para formar un compuesto fluorescente. Se utilizaron diversas sustancias químicas y condiciones cromatográficas específicas, logrando resultados analíticos satisfactorios y una buena recuperación del micronutriente. Moncada y Ruiz (2000), validaron un método para la determinación simultánea de vitaminas (B1, B2, B3 y B9) en cereales utilizando HPLC con una columna RP-18 y una fase móvil de acetonitrilo y buffer fosfato. Se logró una separación clara de las vitaminas y se utilizó una solución de bicarbonato de sodio para la extracción. El método fue validado y demostró ser reproducible y confiable para la determinación de las vitaminas en estudio.

La validación de un método analítico consiste en confirmar que se llevó a cabo adecuadamente y cumplió con las especificaciones establecidas. Es fundamental para garantizar la calidad de los resultados y su uso en las diferentes industrias, farmacéutica, alimentaria, cosmética, entre otras. La norma ISO 17025 (2005) establece los requisitos para la validación, incluyendo pruebas objetivas y registros detallados. Antes de usar métodos nuevos, se deben realizar las verificaciones

y ajustes necesarios. La validación debe incluir parámetros como (ISO 17025, 2005; ICH, 1994): Selectividad, que es la capacidad del método para identificar de manera clara el analito en presencia de otros componentes; Linealidad, que se refiere a su capacidad de proveer resultados de pruebas que sean proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango específico; Precisión: que es el nivel de concordancia entre los resultados de pruebas individuales al realizar el mismo procedimiento analítico en varias muestras de una misma muestra homogénea; Exactitud: que trata de la discrepancia entre el resultado obtenido y el valor real; Límite de detección (LOD): nivel más bajo de analito que se puede detectar en una muestra en las condiciones dadas, aunque no se pueda determinar exactamente la concentración; Límite de cuantificación (LOQ): nivel más bajo de analito que se puede medir con precisión y exactitud en las condiciones establecidas.

Por lo antes expuesto, en la presente investigación se pretende establecer un protocolo que integre sistemas de extracción y separación compatibles, mediante HPLC con el fin de lograr la sensibilidad, precisión y exactitud necesarias para analizar con éxito las vitaminas B1 y B2 en la harina de maíz precocida, así como en otras harinas de cereales. Esto se logra mediante la obtención de picos de analitos limpios, separados y con una resolución adecuada, todo ello con la utilización de un solo rango de longitud de onda durante la separación simultánea. Por ello, en este estudio se empleó el método de análisis de las vitaminas B1 y B2, tomando como referencia lo descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 42 NF 37, 2018) para los ensayos de tabletas, optimizando y validando el mismo para aplicar en muestras

de harinas enriquecidas que contienen las vitaminas antes señaladas.

Por ello, se planteó como objetivo validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) para la determinación de vitamina B1 (tiamina) y vitamina B2 (riboflavina) en cereales. Para eso se procedió a 1. Optimizar las condiciones del método de ensayo por HPLC, partiendo de lo establecido en la USP 42 NF37; 2. Evaluar las separaciones de las vitaminas B1 y B2 utilizando los parámetros de adecuación del sistema; 3. Establecer el tratamiento adecuado de la muestra, para la extracción y cuantificación de las vitaminas en estudio; 4. Diseñar un protocolo de validación para identificar y cuantificar las vitaminas B1 y B2 en la harina de maíz precocida; 5. Validar el método de ensayo desarrollado por HPLC en Fase Reversa para la determinación de tiamina y riboflavina y 6. Aplicar la metodología validada para la identificación y cuantificación de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida.

Materiales y Métodos

Las muestras tanto de harina de maíz precocida como de harina de arroz fueron adquiridas en el mercado local. Se utilizó un cromatógrafo HPLC, marca Waters (USA).

Optimización de las condiciones del método de ensayo por HPLC, partiendo de lo establecido en la USP 42 NF37

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS INICIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS B1 Y B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Se efectuaron pruebas preliminares teniendo en cuenta las condiciones mencionadas por la USP 42 (2018), Tabla I.

Tabla I.
Condiciones cromatográficas iniciales

Parámetros	Condiciones
Detector	UV
Columna	Symetry® C18 5 µm, 4.6 x 150 mm
Velocidad de flujo	1mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Fase Móvil	Metanol grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (27:1:73) 140 mg de 1-Hexanosulfonato de sodio/100 mL
Temperatura	Ambiente
HPLC	Isocrático
Diluyente	Acetonitrilo grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (5:1:94.)

PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Los estándares de vitaminas B1 y B2 se prepararon por separado, para obtener una solución madre de 100 µg/mL de cada uno. Se hicieron tres soluciones de trabajo a partir de la solución madre una con 3 µg/mL para B1, otra con 2 µg/mL para B2 y una mezcla de los estándares bajo estas mismas concentraciones, representando el punto intermedio con una concentración del 100%.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL MÉTODO

Se realizaron modificaciones para optimizar las condiciones del ensayo (Tabla II).

Tabla II.
Modificaciones de los parámetros de ensayo

Parámetros	Modificaciones
Fuerza del solvente	Cambio de metanol por acetonitrilo, manteniendo las mismas proporciones
Composición de la Fase Móvil (FM)	Aumento del 10% en metanol Disminución del 10% en metanol
Cambio de pH	Aumento a pH 3.5 con NaOH 0,1 N Disminución de pH a 2.5 con HCl 0,1 N
Cambio de volumen de inyección	De 10µL a 20 µL
Cambio de flujo	De 1 mL/min a 1.2mL/min

EVALUACIÓN DE LAS SEPARACIONES DE LAS VITAMINAS B1 Y B2 UTILIZANDO LOS PARÁMETROS DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se procedió a inyectar los estándares preparados en el equipo, para evaluar cada uno de los parámetros cromatográficos (Número de platos teóricos o eficiencia, asimetría, selectividad, factor de retención).

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA VITAMINA DE ESTUDIO

Se realizaron varios tratamientos a la muestra a fin de evaluar la mejor extracción de las vitaminas en estudio (Tabla III).

DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA B1 Y VITAMINA B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

El diseño del protocolo de validación se basó en las pautas establecidas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1994) y otros documentos relacionados. Se detallaron los procedimientos necesarios para llevar a cabo la validación, junto con los criterios de aceptación para cada prueba realizada.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS B1 Y B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Se evaluaron los parámetros aptitud del sistema, especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla III.
Protocolo del tratamiento de la muestra

Protocolo	Tratamiento	Reactivo	pH	Enzimas	Incubación	Agitación	Centrifugación
1	Hidrólisis ácida	H ₂ SO ₄ 0,1N	4,5 AcNa 2.5 M	α-Amilasa Amiloglucosidasa 500 mg c/u	18h, 37°C	-	-
2	Hidrólisis ácida	HCl 0,1 N	4,5 AcNa 2.5 M	α-Amilasa Amiloglucosidasa 500 mg c/u	18h, 37°C	-	-
3	Ultrasonido	Solución acuosa	2.5	-	-	1h con magneto en plancha sin calentamiento	3500 rpm Por 10 min

AcNa: Acetato de sodio

APTITUD DEL SISTEMA

Para evaluar la aptitud del sistema se preparó una mezcla de estándares inyectándose 6 veces bajo las condiciones cromatográficas optimizadas. Se determinó el número de platos teóricos (N), factor de cola (T) y el factor de capacidad (k') mediante el programa Breeze[®]. Criterio de aceptación: desviación estándar relativa menor a 2%, $N > 2000$, $k' 1-20$ y $T < 2$ (ICH, 1994).

ESPECIFICIDAD

Se inyectó la mezcla de estándares punto intermedio (6 veces), fase móvil y muestra, (en ambos casos por triplicado) bajo las condiciones optimizadas. Criterio de aceptación: la especificidad en un procedimiento analítico se logra cuando las fases móviles no interfieren con la lectura de los estándares y la muestra, y las señales cromatográficas coinciden entre los estándares y la muestra (ICH, 1994).

LINEALIDAD

La determinación de la linealidad se realizó usando una mezcla de estándares a 5 niveles de concentración.

Se inyectó en el equipo cromatográfico, siguiendo las condiciones óptimas, de la siguiente forma: se inyectaron cinco veces en cada nivel, excepto en el nivel 3 (100%), que se inyectó seis veces (Tabla IV). Se elaboró una curva de calibración utilizando las áreas de los picos cromatográficos de cada componente (concentración vs área). Criterio de aceptación: El coeficiente de correlación entre la concentración real de las soluciones estándares y la señal del equipo para cada una de ellas debe ser mayor que 0,990 (Miller y Miller, 2002).

Tabla IV.

Niveles de concentración de los estándares

Estándares	Concentraciones en µg/mL (ppm)				
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
Tiamina	1	2	3	4	5
Riboflavina	0.5	1	2	3	4

PRECISIÓN

Precisión del sistema: Se consideró la coincidencia de la señal de la mezcla de estándares dentro de un período de tiempo corto, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas. Para ello se preparó la mezcla de los estándares (100%), obteniéndose una solución con 3 µg/mL de tiamina y 2 µg/mL de riboflavina. Para la precisión del sistema, las soluciones de la mezcla

de estándares fueron analizadas para 6 réplicas en un día. Criterio de aceptación: El valor del porcentaje de desviación estándar relativa debe ser menor a 2,0% (ICH, 1994).

Precisión del método: Se realizaron dos ensayos, llevados a cabo en dos días consecutivos y se determinó el porcentaje de desviación estándar relativa. La solución de la mezcla de estándares al 100%, fue evaluada para 6 réplicas en 2 días consecutivos, al igual que dos muestras de harina de maíz precocida. La precisión se expresó como el porcentaje de desviación estándar relativa (%DER). Criterio de aceptación: %DER debe ser <2% (Conferencia Internacional de Armonización, ICH, 1994).

EXACTITUD

Se prepararon tres (3) muestras de 10 mL, se le añadió 80%, 100% y 120% de las cantidades de vitamina B1 y B2, según lo declarado por el fabricante en la HMP, bajo los parámetros cromatográficos optimizados. Se inyectó por triplicado cada muestra y la mezcla de los estándares seis (6) veces. Se obtuvo cada uno de los cromatogramas correspondientes y se determinó el porcentaje de recuperación de los analitos para cada caso (Tabla V). Criterio de aceptación: El % R debe estar entre 70 hasta un 120% en alimentos (ICH, 1994).

Tabla V.
Ecuaciones de exactitud

Cantidad recuperada del analito	Porcentaje de recuperación de aditivos
$CR = CMX\% - CMX$ Donde: CR: cantidad recuperada en μg (diferencia entre la muestra con % agregado y la muestra sin % agregado). CMx%: cantidad de muestra con % agregado (μg)	$\%R = \frac{CR}{C_{Real}} \times 100$ Donde: %R: porcentaje de recuperación CReal: cantidad real (μg) inyectada de muestra con % agregado.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se prepararon tres mezclas de estándares con concentraciones conocidas (por debajo del nivel 1 de concentración) (Tabla VI).

Tabla VI.
Concentración de los estándares

Estándares	Concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ (ppm)		
	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Tiamina	0.25	0.5	0.75
Riboflavina	0.2	0.3	0.4

Se inyectó por triplicado cada una de las mezclas, bajo las condiciones óptimas y se determinaron ambos límites de manera estadística usando la ecuación de Miller y col. (2010) para Límite de detección (LOD): $LOD = 3,3 \times DE/m$ para el Límite de Cuantificación (LOQ): $LOQ = 10 \times DE/m$, donde DE es la desviación estándar de la respuesta y m la pendiente de la curva de calibración.

METODOLOGÍA VALIDADA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINAS B1 Y B2 EN HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Una vez validada la metodología, se aplicó no solo a la muestra de HMP, sino también a una harina de arroz para uso infantil (6 meses a 1 año), enriquecida con tiamina y riboflavina. Se prepararon dos muestras pesando exactamente alrededor de 7,5 g, se le añadió 15 mL de agua grado HPLC para mezclar, y luego se llevó a un volumen de 25 mL. A la muestra 2 se le ajustó el pH a 2,5 con HCl 0,1 N. Se sonicó por 10 minutos y posteriormente se filtró a través de un papel de filtro Whatman No. 42. A continuación se filtró a través de un acrodisc de 0,45 μm antes de inyectar en el equipo HPLC.

Resultados y Discusión

Optimización de las condiciones del método de ensayo por HPLC, partiendo de lo establecido en la USP 42 NF37

VERIFICACIÓN DE LOS MÓDULOS QUE CONFORMAN EL EQUIPO HPLC

Antes de las pruebas, se verificaron los módulos del equipo HPLC y se comprobó que funcionaban correctamente. Se utilizaron los módulos acoplados al Software Breeze® y se demostró la eficiencia de las bombas y el buen funcionamiento de los módulos según las especificaciones del proveedor Waters (2002). También, se determinó la eficiencia de la columna Symetry C18 para el análisis de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Una vez inyectados los estándares de acuerdo con las condiciones iniciales, se obtuvo que el tiempo de retención (RT) para la riboflavina fue 6,935 minutos y 13,431 minutos para la tiamina, por lo que se continuó optimizando los parámetros para lograr la separación en un tiempo menor a 10 minutos (Figura 1).

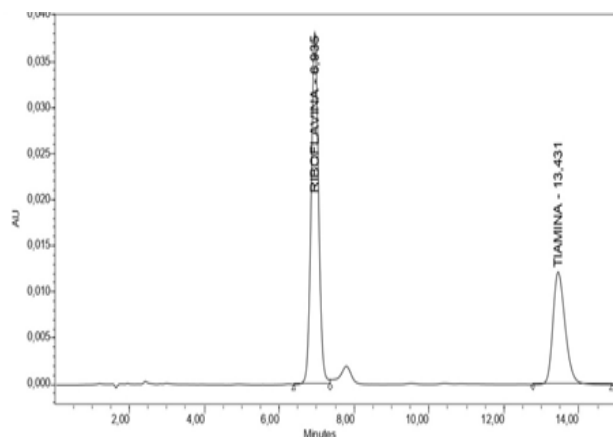


Figura 1. Cromatograma de la mezcla de estándares con las condiciones iniciales

Al modificar la fuerza del solvente sustituyendo metanol por acetonitrilo, no fue posible separar ambos picos, por lo que se regresó a la FM con metanol. Luego se procedió al cambio en la composición de la fase orgánica (10% más y 10% menos de MeOH), disminución del pH, aumento del volumen de inyección y aumento del flujo. En la Tabla VII se muestran los resultados óptimos en los parámetros de adecuación.

Tabla VII.
Condiciones optimizadas para el método de ensayo

Parámetros	Condiciones
Detector	UV
Columna	Symetry® C18 5 µm, 4.6 x 150 mm
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Fase Móvil	10% más de metanol grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (29,4:1:69,60) más 140 mg de 1-Hexanosulfonato de sodio/100 mL pH= 2.5
Temperatura	Ambiente
HPLC	Isocrático
Diluyente	Acetonitrilo grado HPLC, ácido acético glacial y agua grado HPLC (5:1:94)

EVALUACIÓN DE LAS SEPARACIONES DE LAS VITAMINAS B1 Y B2 UTILIZANDO LOS PARÁMETROS DE ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Una vez optimizado el método de ensayo, se inyectó la mezcla de estándares para evaluar la separación de los estándares (Figura 2).

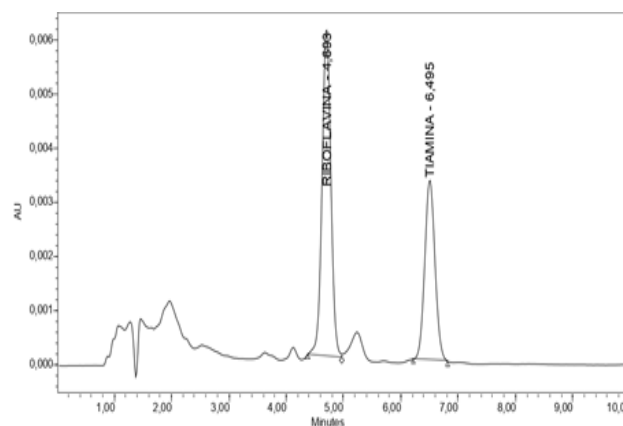


Figura 2. Cromatograma de la mezcla de estándares con las condiciones óptimas

Estas condiciones generaron resultados conformes en la separación de los estándares con valores para RT, N, T y k' adecuados (Tabla VIII).

Tabla VIII.

Resultados al optimizar el método

Analito	RT	% Área	N	K'	T
Riboflavina	4,693	61,10	4508,478	3,692764	0,9980968
Tiamina	6,495	38,90	6169,593	5,494835	1,067066

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA, PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS VITAMINAS EN ESTUDIO

La hidrólisis con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, respectivamente, acompañados con enzimas, no resultaron adecuados, lo que se reflejó en los resultados de las áreas obtenidas al inyectar las muestras con esos tratamientos. Quizás la naturaleza de la muestra, al ser una HMP, en la que se encuentra el almidón pregelatinizado, además del uso de temperatura para la actuación de las enzimas, impidieron la liberación de los analitos de vitaminas B1 y B2 presentes en la muestra. Mientras que el tratamiento de la muestra, empleando agitación, ultrasonido, filtración y centrifugación, arrojó los mejores resultados.

DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE VALIDACIÓN PARA IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR LAS VITAMINAS B1 Y B2 EN LA HARINA DE MAÍZ PRECOCIDA

Una vez optimizados cada uno de los parámetros que garantizan un menor tiempo de ensayo con las mejores condiciones, se aplicó el diseño de protocolo de validación del método a través de las pautas establecidas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1994).

Validación del método de análisis para la determinación de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida

APTITUD DEL SISTEMA

Una vez realizadas las seis inyecciones consecutivas de la mezcla de patrones (3 ppm de vitamina B1 y 2 ppm de vitamina B2), según las condiciones óptimas reflejadas en la Tabla VIII, se calcularon los promedios, desviaciones estándar y desviaciones estándar relativas de cada parámetro (tiempos de retención y áreas) (Tabla IX).

Tabla IX.

Aptitud del sistema para el tiempo de retención y área, bajo las condiciones óptimas establecidas

Parámetros	Riboflavina		Tiamina	
	Área	RT (min)	Área	RT (min)
Promedio	64401,83	4,67	41453,00	6,47
DESV STD	527,48	0,0019	89,31	0,017
% DER	0,82	0,41	0,22	0,26

Esto indica que el método cromatográfico utilizado genera resultados consistentes y fiables, con desviaciones estándar relativas que son menores al 2%.

En resumen, los valores obtenidos para los platos teóricos y el factor de capacidad en la cromatografía de riboflavina y tiamina cumplen con los estándares aceptables según la bibliografía. Además, los picos cromatográficos presentan una simetría adecuada y no tienen colas pronunciadas, lo que indica un método válido para la determinación de estos analitos (Tabla X).

ESPECIFICIDAD

Al estudiar los cromatogramas generados al inyectar la fase móvil, se pudo verificar

Tabla X.

Aptitud del sistema para los parámetros RT (tiempo de retención), N (número de platos teóricos), k' (factor de capacidad), T (factor de cola) y Rs (resolución), bajo las condiciones óptima

Compuesto	RT (min)	N	k'	T	Rs
Riboflavina	4,69	4.508,48	3,69	1,00	5,80
Tiamina	6,50	6.169,59	5,49	1,07	5,96

que no hubo interferencias que afectaran los picos de la mezcla de estándares, lo que confirma que el método utilizado para la determinación de vitaminas B1 y B2 no es influenciado por los componentes de las fases móviles.

Al inyectar la mezcla de los estándares (6 réplicas) y la muestra (3 réplicas) bajo las condiciones óptimas, se generaron cromatogramas que facilitaron la comparación de los tiempos de retención de cada pico cromatográfico relacionado con cada compuesto. Los resultados, revelaron una coincidencia en las señales cromatográficas de los estándares y la muestra (Tabla XI).

Tabla XI.

Tiempos de retención de los estándares y de la muestra de harina de maíz precocida inyectada

Compuestos	Promedio RT (min)	
	Mezcla de estándares	Muestra de harina de maíz precocida
Riboflavina	4,693±0,18	4,678±0,16
Tiamina	6,495±0,16	6,415±0,11

Además, se logró una buena separación de los dos compuestos en menos de 10 minutos a una longitud de onda de 280 nm, obteniendo picos estrechos y simétricos con una resolución óptima. Los resultados demostraron una selectividad satisfactoria en el sistema de HPLC, basados en la identificación de los picos de las vitaminas analizadas.

LINEALIDAD

Se construyó una curva de calibración utilizando la señal cromatográfica de los compuestos analizados en diferentes niveles de concentración en partes por millón (ppm), como se muestra en la Tabla IV. Los niveles de concentración de los estándares abarcan desde 1 a 5 ppm para la tiamina y de 0,5 a 4 ppm para la riboflavina. Se realizaron múltiples inyecciones de cada nivel de concentración de la mezcla de solución estándar, siguiendo las condiciones optimizadas.

La calibración estándar externa demostró ser efectiva para aplicaciones cuantitativas, con resultados lineales en un rango de concentraciones y coeficientes de determinación (R^2) dentro de los límites aceptables ($> 0,990$) (Figuras 3 y 4).

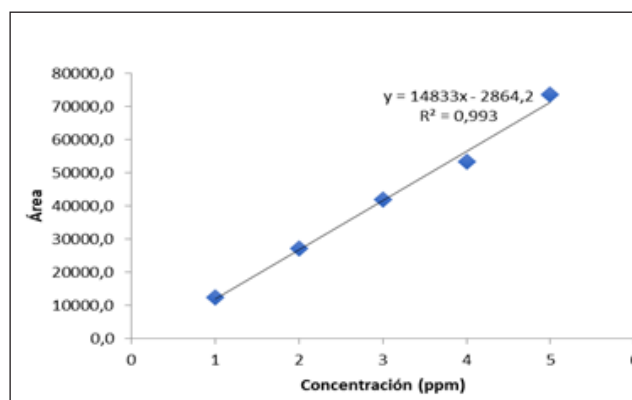


Figura 3. Curva de calibración para linealidad de la tiamina (Concentración vs. Área)

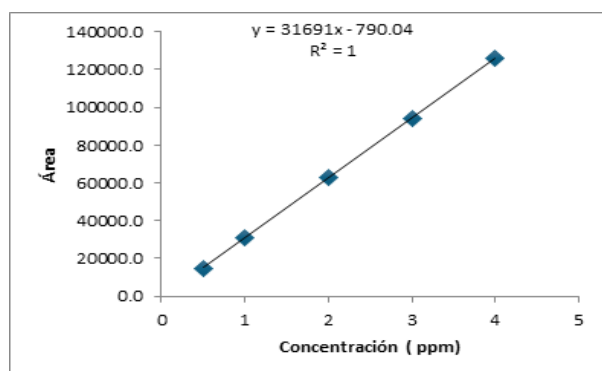


Figura 4. Curva de calibración para linealidad de la riboflavina (Concentración vs. Área)

PRECISIÓN

Se evaluó la precisión del método analítico a través de la reproducción de resultados en un mismo día (precisión del sistema) y en días diferentes (precisión del método). Se realizaron seis réplicas en un día utilizando soluciones de mezcla de estándares y se obtuvieron los promedios de las áreas en las inyecciones.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La desviación estándar relativa (DER) obtenida de las inyecciones realizadas es inferior al 2%, lo que demuestra que cumple con el criterio de aceptación para el parámetro de repetibilidad establecido. Estos resultados confirman la precisión, donde el área para la Riboflavina fue de $67892,5 \pm 78,1$ (% DER: 0,12) y para la Tiamina fue de $41896 \pm 511,22$ (% DER: 1,22).

En el cromatograma correspondiente se pueden observar la Precisión del Sistema (Figura 5), con concentraciones de tiamina 3 ppm y riboflavina de 2 ppm, bajo las condiciones optimizadas.

PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se evaluó la precisión interdiaria del método mediante pruebas realizadas en diferentes días, el mismo analista y con el mismo equipo. Se realizaron determinaciones en dos días consecutivos utilizando soluciones estándar con 6 réplicas cada una, bajo las condiciones cromatográficas optimizadas.

Se puede observar en la Tabla XII como todas las desviaciones estándar relativas se encuentran por debajo del 2%, cumpliendo con el criterio de aceptación.

Los resultados de la precisión del método para la muestra de harina de maíz precocida, bajo condiciones optimizadas, arrojaron para la tiamina una desviación estándar relativa de 0,40% y para la riboflavina 0,53%, lo que indica que las inyecciones realizadas (estándares y muestra), cumplen con el criterio de aceptación para la repetibilidad, menor al 2% de desviación estándar relativa, demostrando que el método es preciso. Donde el área para la Riboflavina fue de $60158,5 \pm 329$ (% DER: 0,53) y para la Tiamina fue de 30765 ± 138 (% DER: 0,40).

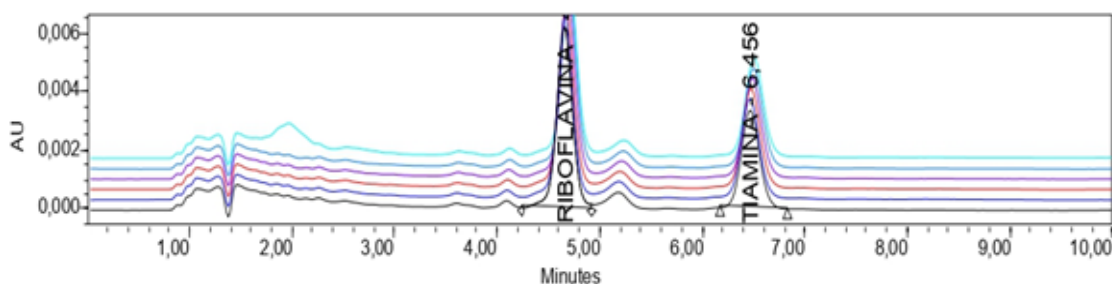


Figura 5. Cromatograma de las 6 inyecciones de la mezcla de estándares en el punto medio (100%), tiamina 3 ppm y riboflavina 2 ppm, para el ensayo de la Precisión del Sistema

Tabla XII.
Precisión del método para los estándares de tiamina y riboflavina

Inyección punto intermedio	Área			
	Riboflavina		Tiamina	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Promedio	62792	67892,5	37395,67	41896
DESV STD	291,1	78,71	108,83	511,22
% DER	0,46	0,12	0,29	1,22

EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran en el rango de aceptación establecido (70-120%), siendo el valor más bajo (81,42%) para la riboflavina en la muestra con un agregado del 100%, y el más alto (115,02%) para tiamina, con valores de desviación estándar relativa inferiores al 2%, resultando entre 0,43 y 1,57 %, lo que indica que el método es exacto para los analitos evaluados (Tabla XIII).

LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

Se determinó la sensibilidad del método para detectar y cuantificar los analitos utilizando los datos de concentración y áreas obtenidos al inyectar las tres mezclas de estándares a concentraciones conocidas (Tabla VIII), siguiendo las condiciones óptimas establecidas.

Los resultados obtenidos, aplicando la Ecuación de Miller, para Riboflavina fue $y=32500x-1070$ y para Tiamina fue $y=14900x-1620$, esto indica que la LOD para riboflavina y la tiamina se detectan a 0,16 ppm y 0,19 ppm, sin necesariamente ser cuantificados. La mínima concentración en que se pueden cuantificar los analitos en estudio (LOQ) es 0,48 ppm para la riboflavina y 0,56 ppm para la tiamina. El valor de R2 para la Riboflavina fue 0,9931 y la Tiamina de 0,9915.

Aplicación de la metodología validada para la identificación y cuantificación de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida y harina de arroz

En la Figura 6, se muestra el cromatograma de los resultados obtenidos de las vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida.

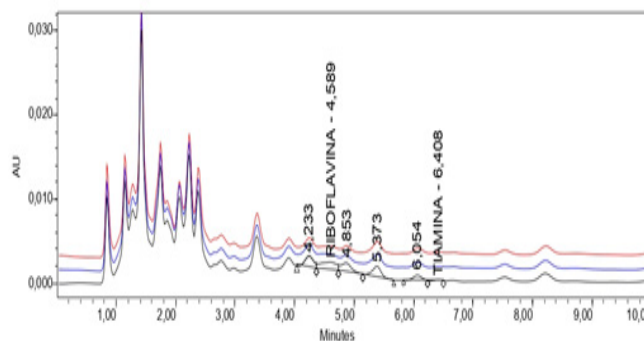


Figura 6. Cromatograma de la identificación y cuantificación de las vitaminas B2 y B1 en harina de maíz precocida

Tabla XIII.
Exactitud del método para las vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida, bajo las condiciones optimizadas

Parámetros	Tiamina			Riboflavina		
	80%	100%	120%	80%	100%	120%
% Recuperación	115,02	105,48	103,93	90,96	81,42	102,27
DESV STD	1,44	1,54	0,48	0,39	0,40	1,61
% DER	1,26	1,46	0,47	0,43	0,49	1,57

Con respecto a la harina de maíz precocida, se encontró en la muestra tratada valores para las vitaminas B1 y B2, similares a lo que declara el fabricante (Tabla XIV).

Tabla XIV.

Comparación de los valores de vitaminas B1 y B2 en harina de maíz precocida

Vitaminas	Declarado por el fabricante	Encontrado en el ensayo
Riboflavina	0,24 mg/100 g de producto	0,222 mg/100g de producto
Tiamina	0,31 mg/100 g de producto	0,316 mg/ 100 g de producto

En el caso de la harina de arroz, se encontró en la muestra tratada valores para las vitaminas B1 y B2 muy cercanos al reportado por el fabricante (Figura 7 y Tabla XV).

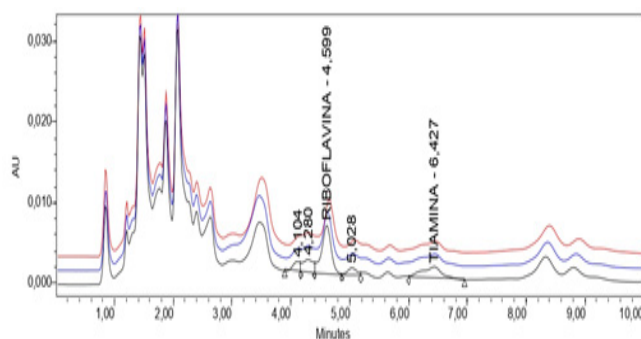


Figura 7. Cromatograma de la identificación y cuantificación de las vitaminas B2 y B1 en harina de arroz

Tabla XV.

Comparación de los valores de vitaminas B1 y B2 en Harina de arroz

Vitaminas	Declarado por el fabricante	Encontrado en el ensayo
Riboflavina	0,14mg/30 g de producto	0,12 mg/30 g de producto
Tiamina	0,3 mg/30 g de producto	0,2 mg/ 30g de producto

Los valores declarados por el fabricante se basaron en los requerimientos diarios establecidos por el Instituto Nacional de Nutrición para niños de 6 a 11 meses de edad.

Conclusiones

- Se desarrolló y optimizó un método para la separación, identificación y cuantificación simultánea de vitaminas B1 y B2, tomando como punto de partida el método establecido por la USP, cambiando la composición de la Fase Móvil, aumentando el 10% de la concentración de metanol, disminuyendo el pH a 2.5, incrementando el volumen de inyección a 20 uL y modificando el flujo a 1,2 mL/min.
- El método propuesto proporciona una linealidad y precisión comparables al método de referencia establecido por la USP.
- El método propuesto tiene la ventaja de determinar rápida y simultáneamente ambas vitaminas en una sola corrida cromatográfica, a una misma longitud de onda, siendo menor el tiempo consumido en el ensayo.
- Se demostró que el método HPLC desarrollado puede ser aplicado para el análisis de productos derivados de cereales enriquecidos.
- Se determinó que la muestra de harina de maíz precocida tiene un contenido de vitaminas B1 y B2 similar al declarado por el fabricante.
- En general, las vitaminas analizadas revelaron valores de número de platos teóricos (N), factor de cola (T) y factor de capacidad (K') dentro de los criterios de aceptación establecidos para la aptitud del sistema.
- Se diseñó un protocolo de validación, de acuerdo con la ICH 1994, para

la identificación y cuantificación de tiamina y riboflavina, logrando tener las instrucciones detalladas de las operaciones, orden en la ejecución del trabajo y los criterios de aceptación.

- La evaluación de la linealidad demostró que hubo un coeficiente de correlación para cada analito mayor a 0,990.
- El método cromatográfico desarrollado es preciso, al presentar Desviaciones estándar relativas menores al 2% para la precisión del sistema (áreas) en un día y para la precisión del método (áreas) en días consecutivos.

Recomendaciones

- Evaluar otros métodos de extracción para las vitaminas B1 y B2 en muestras de harina de maíz y arroz.
- Aplicar el método de ensayo en otras muestras de harina de maíz precocida, para comprobar el contenido de vitaminas B1 y B2.
- Estudiar otras vitaminas del complejo B, que pudieran estar presentes en harinas de cereales

Referencias Bibliográficas

AOAC. 2011. In: Horwitz W, Latimer Jr. G. (Eds.), Official methods of analysis of AOAC international, 18th ed, Revision 4. AOAC, Gaithersburg.

BNF (Fundación Británica de Nutrición). 1994. Alimentos ricos en almidón en la dieta. BNF, Londres.

Chávez JF. 2020. El enriquecimiento de la harina de maíz precocida y de la harina de trigo en Venezuela. Una gestión con éxito. Org.ve. Available from: <https://www.analesdenutricion.org.ve/ediciones/2020/1/art-9/>

FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura). 2002. Agricultura mundial:Hacia 2015/2030. Informe resumido. FAO, Roma.

Fernández Falcó L, González G, Creagh Banderas I, Betancourt Y, Savón A. 2013. Algunas consideraciones acerca de la tiamina o vitamina B1. Revista Información Científica 81(5).

Gaceta Oficial de la República de Venezuela. No 35.032. 1992. Decreto No 2.492. Creación de la Comisión para el Enriquecimiento Nutricional de Alimentos.

ICH. 1994. Guía Q2 de la Conferencia Internacional de Armonización. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 1994.

INN (Instituto Nacional de Nutrición). Tabla de Composición de Alimentos para Uso Práctico. Revisión 1999. Primera reimpresión Enero 2001. Publicación No 54. Serie Cuadernos Azules. Venezuela.

ISO 17025:2005. Norma internacional ISO 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, Suiza.

Lynch PLM, Young IS, 2000. Determinación de tiamina mediante cromatografía líquida de alta resolución. Revista de Cromatografía A 881 (1e2), 267e284.

Martín MI, del Portal JI, del Portal JCI. 2000. Vitaminas y minerales. Editorial Complutense.

McKevith B. 2004. Nutritional aspects of cereals. Nutr Bull 29(2):111-42.

Miller J, Miller J. 2002. Método de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. En: Estadística quimiometría para química analítica. España: Prentice Hall115-116.

Miller JR, Outlaw RA, HollowayBC. 2010. Graphene Double-Layer Capacitor with ac Line-Filtering Performance. Science 329:1637-1639.

Moncada J, Ruiz LM. 2000. Estandarización y validación de un método para la determinación simultánea de vitaminas tiamina B1, riboflavina b2, niacina b6 y ácido fólico B9, utilizando HPLC. Revista Colombiana De Química 29(1):73-77.

Norma Venezolana COVENIN 2135:1996. Harina de maíz precocida. (3^{era}. Revisión).

Norma Venezolana COVENIN 2552-1:1997. Directrices para la declaración de propiedades nutricionales y de salud en el rotulado de los alimentos envasados.

PAHO (Organización Panamericana de la Salud). 2008. La Armonización RPP, la Reglamentación Farmacéutica de buenas prácticas para

- laboratorios nacionales de control farmacéutico. Paho.org. Available from: https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/Informe_36_Anexo_3.pdf
- Pardo Arquero VP. 2004. La importancia de las vitaminas en la nutrición de personas que realizan actividad físico-deportiva. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte* 4 (16): 233-242.
- Pérez Ríos M, Ruano A. 2004. Vitaminas y salud. *Offarm* 23(8):96-106.
- Rodríguez R, Fernández-Ruiz V, Cámara M, Sánchez-Mata MC. 2011. Determinación simultánea de vitamina B1 y B2 en alimentos complejos a base de cereales, mediante HPLC-UV isocrática de fase inversa. *Revista de Ciencia de los Cereales* 55(2012): 293e299
- Scrimshaw NS. 2005. La Fortificación de Alimentos: Una Estrategia Nutricional Indispensable. *An Venez Nutr* 18(1):64-8.
- Trinidad F. 2020. Validación de un método cromatográfico para determinar tiamina y riboflavina, en harina de trigo fortificada. Available from: <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/25301/TM-1994.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- USP 42 NF 37. 2018. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional.
- Vizueté Pambabay SD. 2015. Validación de la técnica de cuantificación de vitamina B1 por el método de HPLC en harina de trigo fortificada. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6421>
- Zambrano S, Sosa S. 2018. Evolución de consumo de alimentos Edu.ve. Available from: <https://www.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/2019/05/IIESUCAB-Zambrano-Sosa-Informe-Consumo-Alimentos-08-2018.pdf>



Desarrollo y validación de un método analítico RP-HPLC para la determinación cuantitativa de Dipirona en tabletas

Development and validation of an RP-HPLC analytical method for the quantitative determination of Dipyrone in tablets

LUIS A. TINEO A^{*1}, MARISABEL BOR²

Resumen

La dipirona, también conocida como metamizol, se emplea de manera extensiva para tratar tanto el dolor agudo como el crónico. Es efectiva en situaciones de dolor postoperatorio, migrañas, cólicos renales y dolores oncológicos, además de actuar como antipirético en casos de fiebre persistente. Para su análisis y cuantificación, se utilizan diversas técnicas analíticas como HPLC, yodometría, sistemas FIA con detección amperométrica, espectrofotometría, electroforesis capilar, RMN y voltamperometría. Sin embargo, varios textos farmacopeicos oficiales limitan la cuantificación a la yodometría, lo que restringe la evaluación de impurezas. Por esta razón, se desarrolló y validó un método específico de RP-HPLC que es lineal, exacto y preciso, cumpliendo con los requisitos establecidos por la USP 42 en su apartado <1225>. Las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación del principio activo incluyen el uso de una columna XTerra® RP18 (3,5 μ m x 4,6 mm x 100 mm), un flujo de 0,8 mL/min con una fase móvil compuesta por agua, ácido acético glacial y metanol en proporciones (73:1:27) % v/v junto con 140 mg de hexanosulfonato de sodio (pH= 3,20), un volumen de inyección de 20 μ L y detección a 260 nm en un detector UV. El método resultó ser selectivo, exacto, preciso, robusto y lineal en un rango de concentración de 0,008 a 0,0120 mg/mL. Este método no solo permite una cuantificación precisa de las tabletas de Dipirona, sino que también facilita la evaluación de impurezas, contribuyendo significativamente a los estudios de estabilidad y al control de calidad en laboratorios analíticos.

Palabras clave: Dipirona, validación, RP-HPLC, cuantificación, tabletas

Abstract

Dipyrone, also known as metamizole, is used extensively to treat both acute and chronic pain. It is effective in postoperative pain, migraines, renal colic, and cancer pain, and antipyretic in cases of persistent fever. Various analytical techniques are used for its analysis and quantification, such as HPLC, iodometry, FIA systems with amperometric detection, spectrophotometry, capillary electrophoresis, NMR, and voltammetry. However, several official pharmacopeial texts limit quantification to iodometry, which restricts the evaluation of impurities. For this reason, a specific RP-HPLC method was developed and validated that is linear, exact and precise, meeting the requirements established by USP 42 in its section <1225>. The chromatographic conditions for the separation and quantification of the active ingredient include the use of an XTerra® RP18 column (3.5 μ m x 4.6 mm x 100 mm), a flow of 0.8 mL/min with a mobile phase composed of water, glacial acetic acid and methanol in proportions (73:1:27) % v/v together with 140 mg of sodium hexane sulfonate (pH =3.20), an injection volume of 20 μ L and detection at 260 nm in a UV detector. The method was selective, accurate, precise, robust, and linear in a concentration range of 0.008 to 0.0120 mg/mL. This method not only allows accurate quantification of Dipyrone tablets but also facilitates the evaluation of impurities, contributing significantly to stability studies and quality control in analytical laboratories.

Keywords: Dipyrone; validation, RP-HPLC, quantification, tablets

*Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Correspondencia: tineo.antequera@gmail.com

Orcid: [0000-0002-3046-9673](https://orcid.org/0000-0002-3046-9673)
[0009-0009-4422-9054](https://orcid.org/0009-0009-4422-9054)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.14](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.14)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 25/11/2024
Aprobación: 04/12/2024

Introducción

El dolor y la fiebre son síntomas comunes que afectan a muchas personas en el mundo. El dolor puede surgir de diversas condiciones médicas, como lesiones o enfermedades crónicas, mientras que la fiebre es un aumento temporal de la temperatura corporal, que constituye una parte de la respuesta general del sistema inmunitario del cuerpo ante infecciones o inflamaciones. Ambos síntomas pueden impactar negativamente la calidad de vida de los pacientes.

La Dipirona es uno de los medicamentos más utilizados para aliviar el dolor y la fiebre, actuando como antipirético y analgésico. Es ampliamente prescrita a nivel mundial para el manejo del dolor agudo, como el postoperatorio o el asociado al cáncer, cólicos y migrañas (Machado-Alba y col., 2019). La dipirona (metamizol) es un analgésico y antipirético del grupo de las pirazolonas; se considera un derivado soluble de la aminopirina. También tiene propiedades antiinflamatorias y espasmolíticas, cuantitativamente de menor magnitud. Igual que otros miembros del grupo, la dipirona inhibe la acción de la ciclooxigenasa y, en consecuencia, la síntesis de prostaglandinas, acción que parece explicar sus propiedades analgésicas y antipiréticas. También la dipirona es capaz de modular los sistemas endógenos opioide y cannabinoide, respectivamente. Ambos sistemas, depresores del sistema nervioso central (SNC), son capaces de producir efectos analgésicos tanto en animales de experimentación como en humanos al interferir con la transmisión de las señales dolorosas (nociceptivas) desde la periferia hasta los centros superiores del SNC (Buitrago-González y col., 2014). Sin embargo, su uso puede

estar relacionado con reacciones adversas graves, como agranulocitosis, lo que ha generado controversias sobre su seguridad. La incidencia de agranulocitosis varía significativamente entre regiones, posiblemente debido a factores como polimorfismos genéticos y condiciones de salud del paciente (Davrieux y col., 2007; Buitrago-González y col., 2014). Esta variabilidad resalta la importancia de un seguimiento médico cuidadoso cuando se prescribe Dipirona.

A pesar de los riesgos asociados, la Dipirona sigue siendo popular en Europa y América Latina. Algunos estudios sugieren una relación entre su uso y la mortalidad, mientras que otros indican que es segura y bien tolerada cuando se utiliza bajo supervisión médica. En países angloamericanos y Escandinavia, la Dipirona no está disponible debido a preocupaciones sobre su seguridad (Buitrago-González y col., 2014; Tomidis y col., 2023). En Venezuela, la Dipirona está disponible en tabletas y soluciones inyectables, ya sea asociada o no con otros principios activos, y se puede obtener con o sin prescripción médica. La importancia de desarrollar métodos analíticos precisos para su determinación radica en la necesidad de garantizar la calidad, seguridad y eficacia del producto final.

Existen varios métodos para la valoración del Metamizol sódico (ingrediente farmacéutico activo, IFA) en la Dipirona, así, se ha reportado un método volumétrico (Iodometría, técnica del fabricante). Este método es el más empleado en la industria farmacéutica, y está descrito en diferentes Farmacopeas (Farmacopea Argentina, 2013, Farmacopea Británica 2020, Real Farmacopea Española, Edición 3, 2005, Farmacopea China,

1990 y Farmacopea Brasileña, 2010). Actualmente, las monografías oficiales solo incluyen métodos yodométricos para la determinación de Dipirona, y en los países donde su uso está restringido no se han establecido métodos analíticos, lo que resalta la necesidad de investigaciones adicionales, especialmente considerando que Venezuela adopta la USP como texto oficial. La falta de métodos estandarizados y validados puede comprometer la calidad de los productos farmacéuticos, lo que resulta en dosis inexactas que podrían ser ineficaces o peligrosas para los pacientes. Por lo tanto, la implementación de métodos analíticos robustos es crucial para garantizar la seguridad de los pacientes. La cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) se presenta como una técnica analítica ideal para este propósito, debido a su alta precisión y sensibilidad. El método analítico propuesto permite una buena separación y ofrece una precisión y exactitud excepcionales en la cuantificación (Quattrocchi, Abelaira, Laba, 1992). El método analítico propuesto no solo busca mejorar los estándares de control de calidad en la industria farmacéutica, sino que también tiene implicaciones significativas para la salud pública al garantizar tratamientos seguros y efectivos. La validación del método incluye la evaluación de parámetros como linealidad, precisión, exactitud, especificidad y robustez, asegurando que el método propuesto cumpla con los estándares internacionales. Es por ello por lo que no solo contribuirá al control de calidad de los medicamentos que contiene Dipirona en los análisis de rutina, sino que también permitirá establecer protocolos de estabilidad y proporcionará una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones en la industria farmacéutica.

Materiales y Métodos

EQUIPOS

Se utilizó un Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Waters® compuesto por bomba modelo 600E Millipore, automuestreador plus 717 plus Autosampler acoplado a un detector UV-VIS con arreglo de diodos (PDA) modelo 996 con un Software Millennium® 32 integrado a un computador para la adquisición y procesamiento de datos. En la etapa preliminar se utilizó una Columna C18 Kinetex® (2,6 μm x 4,6 mm x 150 mm), una columna C18 Waters® μ Bondapak (10 μm x 3,9 mm x 300 mm), y una columna SGE ProteCol C18 GP 125 (5 μm x 4,6 mm x 250 mm), y para la etapa de desarrollo y validación se utilizó una columna XTerra® RP18 (3,5 μm x 4,6 mm x 100 mm). Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico.

Se utilizó para las pruebas previas de la muestra comercial un estándar de referencia de dipirona 99,8%. Fabricante Sigma-Aldrich. Vigente a la fecha de la investigación.

MUESTRAS

Las muestras analizadas pertenecen a dos productos comerciales en forma de tabletas, ambos con un contenido declarado de 500 mg de Dipirona. Para la fecha del estudio, ambos productos estaban disponibles en el mercado y se podían adquirir en Venezuela. El medicamento A (material de referencia interno; MRI) es fabricado por un laboratorio nacional, mientras que el medicamento B es un producto importado, distribuido por una casa de representación.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE REFERENCIA

Se preparó una solución estándar con una concentración de 0,01 mg/mL utilizando una solución diluyente compuesta por agua, ácido acético y metanol en una proporción de 79:1:20 % v/v. Esta mezcla se empleó como solvente. Para las diluciones posteriores, se utilizó la fase móvil.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se pesó aproximadamente $\frac{1}{4}$ del peso promedio del polvo de tabletas con una precisión de $\pm 0,01$ mg, y se transfirió a un balón aforado de 50 mL, al que se le añadieron 25 mL de una solución diluyente compuesta por agua, ácido acético y metanol en una proporción de 79:1:20 % v/v. La mezcla se agitó en un vórtex durante un minuto y luego se sometió a ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente, se enrasó con la misma solución diluyente hasta alcanzar la línea de aforo. Una cantidad adecuada de esta mezcla se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó durante 5 minutos. A continuación, se tomó una alícuota de 4 mL que se transfirió a un balón aforado de 100 mL, llevándola a volumen con la fase móvil hasta la línea de aforo. Finalmente, se realizó una dilución de 1,00 mL en 10,00 mL utilizando la misma fase móvil, y antes de inyectar la disolución en el cromatógrafo, se filtró con un disco de nylon (PVDF) de 0,45 μm .

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

En la fase preliminar, se utilizaron equipos e insumos disponibles para la determinación de dipirona mediante la técnica de RP-HPLC. Tras establecer las

condiciones del sistema cromatográfico, se llevó a cabo la evaluación de los parámetros cromatográficos y la validación del método, antes de proceder al análisis de un producto comercial.

Para determinar la longitud de onda óptima, se empleó un detector de arreglo de diodos y se realizó un barrido de longitudes de onda en el rango de 200 a 400 nm. En este procedimiento, se utilizó una solución patrón de 0,10 mg/mL en una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción 50:50 % v/v. El máximo de absorción se registró a una longitud de onda de 260 nm, lo que se consideró adecuado para el estudio. El espectro de absorción UV correspondiente se presenta en la Figura 1.

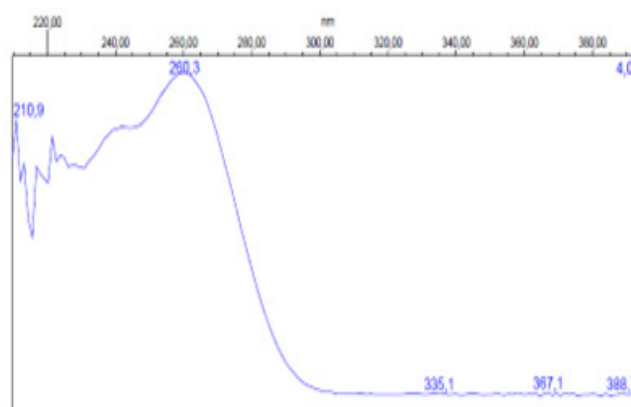


Figura 1. Espectro de absorción UV de Dipirona

La selección de la fase móvil se realizó mediante ensayos que incorporaron diversas combinaciones propuestas en investigaciones previas. Asimismo, se llevaron a cabo preparaciones de múltiples fases móviles hasta identificar la más idónea. Para este propósito, se utilizó una elución isocrática a temperatura ambiente y a una longitud de onda de 260 nm. En la determinación de las fases móviles adecuadas para llevar a cabo las evaluaciones preliminares, se tuvo en cuenta la propiedad ácido-base del

compuesto, dado que la Dipirona presenta un pKa de 4,8. Este dato sugiere que una variación en el pH de la fase móvil podría optimizar la separación. La fase móvil que exhibió los resultados más favorables consiste en un equilibrio de (73:1:27) % v/v entre agua, ácido acético glacial y metanol, complementada con 140 mg de hexanosulfonato de sodio ajustado a un pH de 3,20. El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura 2.

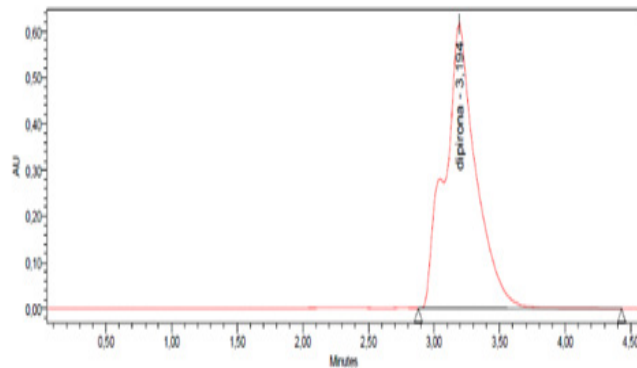


Figura 2. Cromatograma Dipirona agua: ácido acético glacial: metanol, en proporciones (73:1:27) % v/v con 140 mg de hexanosulfonato de sodio pH 3,20 empleando columna XTerra® RP18

La identificación de picos superponibles en el cromatograma sugiere la imperiosa necesidad de optimizar el tratamiento del patrón analítico. La solución diluyente, compuesta por agua, ácido acético glacial y metanol en una proporción específica de 79:1:20, permite la obtención de un pico bien definido, libre de interferencias. Este resultado contrasta notablemente con otros escenarios en los que se presentan señales interferentes y picos no resueltos. Se implementó un protocolo de tratamiento para las muestras de tabletas de Dipirona, logrando una respuesta analítica comparable a la del patrón, como se evidencia en la Figura 3.

La USP establece que los valores de K' para una separación cromatográfica óptima

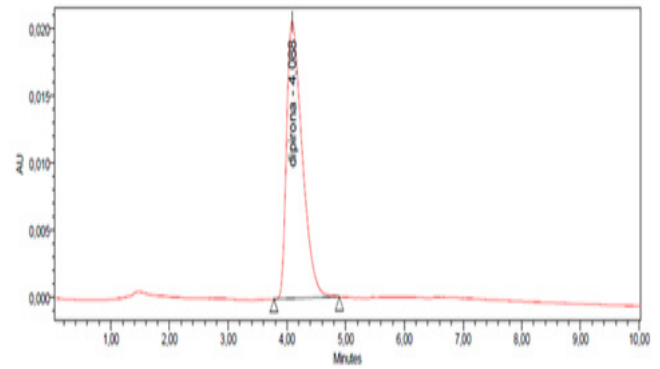


Figura 3. Cromatograma muestra de tableta de dipirona. agua: ácido acético glacial: metanol 79:1:20 como solución diluyente

deben situarse entre 1 y 10. En el análisis de la separación de la Dipirona, se determinó un valor de $K' = 1.300$ en relación con el tiempo muerto correspondiente a la acetona ($T_m = 1,8$ min), lo cual se considera aceptable dentro de los estándares establecidos. Por consiguiente, se concluye que tanto la fase móvil como la solución diluyente empleadas son adecuadas para llevar a cabo la separación de este compuesto.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes: la fase móvil consistió en una mezcla de agua, ácido acético glacial y metanol, en proporciones volumétricas de 73:1:27 % v/v, complementada con 140 mg de hexanosulfonato de sodio ($\text{pH} = 3,2 \pm 0,1$). Se utilizó un volumen de inyección de 20,0 μL y una velocidad de flujo de 0,8 mL/min, manteniendo la temperatura ambiente. La columna empleada fue una XTerra® RP18 (3,5 μm x 4,6 mm x 100 mm), y una longitud de onda de 260 nm.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Una vez desarrollada la metodología analítica, se procedió a su validación

conforme a la categoría I del apartado <1225> de la USP 42, destinada a la cuantificación de principios activos en productos farmacéuticos terminados.

Para evaluar la idoneidad del sistema cromatográfico, se inyectaron cinco réplicas de un patrón que contenía 0,01 mg/mL, bajo las condiciones cromatográficas previamente establecidas. Este procedimiento se llevó a cabo antes de cada estudio relacionado con los parámetros de validación.

Se considera que el sistema cromatográfico es apto para su uso cuando los resultados obtenidos para los parámetros de tiempo de retención y área de los picos presentan una dispersión mínima en el conjunto de datos, lo que se traduce en coeficientes de variación inferiores al 2%.

Estos valores se encuentran dentro de los límites estipulados para métodos cromatográficos, según lo establecido por la USP, que define un límite del 2% como criterio para la precisión de los métodos analíticos.

LINEALIDAD

Se estableció un valor de concentración de referencia para el patrón de Dipirona, siendo 0,01 mg/mL la concentración que corresponde al 100%. A partir de este valor, se elaboraron patrones que abarcaron un rango del 80 al 120%.

En diferentes días, se realizaron tres curvas de calibración. Cada una de ellas consistió en cinco concentraciones distintas de patrones, que se situaron aproximadamente entre 0,008 y 0,012 mg/mL de Dipirona. Luego, se inyectó cada patrón en el cromatógrafo y se

construyeron las curvas de calibración, representando gráficamente el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito de interés. A continuación, se determinó tanto el coeficiente de correlación (R) como el coeficiente de determinación (R^2)

La linealidad se verificó a través de los coeficientes de variación de los factores de respuesta (f). De acuerdo con la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI), el factor de respuesta (f) ilustra la relación entre la lectura o respuesta (área) y la concentración, lo que puede verse como una medida de la sensibilidad del calibrado. En una calibración lineal, los factores de respuesta deben ser similares entre sí y estar cercanos al valor de la pendiente. Coeficientes de variación (CV) mayores al 5% podrían señalar una posible falta de linealidad, por lo que se aconseja que no excedan el 2%. Estos datos también son sustentados al realizar el análisis de residuales.

PRECISIÓN

Se evaluó la precisión del método mediante la determinación de la exactitud del sistema cromatográfico, abarcando tanto la repetibilidad como la precisión intermedia. Para llevar a cabo esta evaluación, se analizaron un conjunto considerable de muestras, lo que facilitó el cálculo estadístico de la desviación estándar y el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

PRECISIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se llevó a cabo una evaluación de la precisión del sistema cromatográfico

mediante la inyección repetida de una solución patrón que contenía 0,010 mg/mL de Dipirona en cinco ocasiones. Posteriormente, se calculó el coeficiente de variación correspondiente, tanto para las áreas como para los tiempos de retención.

REPETIBILIDAD

Se llevó a cabo mediante la preparación de seis muestras del MRI al 100 % (0,010 mg/mL de Dipirona), siguiendo las especificaciones establecidas para la preparación de la muestra. Cada muestra fue inyectada por duplicado en el cromatógrafo. A partir de las áreas obtenidas de estas muestras y de una curva de calibración elaborada ese mismo día, se determinó el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de Dipirona (mg/tab), así como el porcentaje en relación con lo declarado.

PRECISIÓN INTERMEDIA

En este estudio, se realizó un análisis específico de la precisión intermedia en diferentes días, empleando un mismo equipo. Para ello, se prepararon tres muestras al 100% del MRI (0,010 mg/mL de Dipirona), siguiendo las especificaciones. Cada muestra fue inyectada por duplicado en el cromatógrafo. A partir de las áreas obtenidas de estas muestras y de una curva de calibración elaborada para cada día, se calcularon el valor promedio y el coeficiente de variación de la cantidad de Dipirona en mg/tab.

ESPECIFICIDAD

Dado que no se contaba con sustancias relacionadas ni impurezas, la especificidad

se evaluó a través de un ensayo de degradación forzada. Este procedimiento se realizó utilizando indicadores de estabilidad, exponiendo las muestras a condiciones de estrés antes de su inyección en el sistema cromatográfico. Posteriormente, se analizó la pureza de los picos cromatográficos mediante la comparación de los valores del ángulo de pureza (PA) y el umbral de ruido (TH). Esta evaluación es fundamental para identificar la presencia de impurezas y productos de degradación, tanto en la materia prima como en los excipientes; si el valor de PA supera al de TH, se infiere que puede haber coelución de alguna impureza con el analito. El ensayo consistió en pesar aproximadamente $\frac{1}{4}$ del peso promedio del MRI en un matraz de 50,00 mL, sometiendo cada muestra a las siguientes condiciones de degradación forzada:

Fotólisis: Exposición a radiación UV a 254 nm durante 7 días.

Hidrólisis Ácida: Se añadieron 15,00 mL de ácido clorhídrico (HCl) 1N y se mantuvo en reposo durante 7 días, protegido de la luz.

Hidrólisis Básica: Se incorporaron 15,00 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y se dejó reposar por 7 días, resguardado de la luz.

Oxidación: Se añadieron 15,00 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10 % y se dejó reposar durante 7 días, protegido de la luz.

Termólisis: La muestra fue calentada en un baño de vapor a una temperatura constante de 60 °C durante 1 hora.

Para el ensayo de termólisis se empleó un balón aforado de vidrio Jenna de 50,00 mL capaz de soportar los cambios

de temperatura. Una vez finalizado el tiempo de exposición, se continuó con el procedimiento indicado para la preparación del material de referencia. Además, se preparó un patrón al 100% con una concentración de 0,01 mg/mL de Dipirona. La muestra control, que fue preparada y analizada, se dejó reposar durante 1 día protegida de la luz para su posterior reanálisis, con el objetivo de evaluar la degradación del análisis del medicamento a lo largo del tiempo. Este análisis se complementó con el estudio de pureza del pico cromatográfico correspondiente a cada ensayo.

EXACTITUD

La exactitud se determinó utilizando el método de agregado de estándar, que consiste en añadir una cantidad conocida de un patrón con una concentración establecida a las muestras, abarcando diferentes niveles de concentración. Para ello, se incorporó una cantidad específica de un patrón de concentración conocida al material de referencia y se calculó el porcentaje de recuperación. Para llevar a cabo esta evaluación, se prepararon soluciones de muestras fortificadas (spike) en tres niveles de concentración distintos: 75%, 100% y 125% de la concentración normal de trabajo. Cada nivel se analizó mediante muestras independientes preparadas por triplicado. Finalmente, se calculó el porcentaje de recuperación se utilizó como indicador de la exactitud de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{Conc. Muestra+Spike} - \text{Conc. Muestra}}{\text{Concentración Patrón}} \times 100$$

Las concentraciones de las muestras se calcularon utilizando una curva de

calibración elaborada el mismo día del análisis.

Robustez

La evaluación de la robustez del método se realizó mediante una serie de parámetros que permiten medir la idoneidad del sistema. Esto garantiza que el procedimiento analítico utilizado mantenga su validez. Los parámetros definidos para esta evaluación incluyen el flujo de la fase móvil, el pH de la fase móvil y la composición del disolvente orgánico, específicamente el porcentaje de metanol. La utilización del diseño de la matriz de Plackett y Burman facilitó un análisis exhaustivo del impacto que tienen las variables seleccionadas al ser modificadas ligeramente. Posteriormente, se verifica si alguna de las variables influye significativamente en el resultado. Esta comprobación se realiza evaluando la diferencia obtenida por el cambio en el parámetro con el producto de S y la raíz cuadrada de 2, según se indica en la siguiente expresión:

$$\text{Si } |V_B| > s\sqrt{2} \Rightarrow \text{Diferencia significativa}$$

Donde V_B representa el módulo de la diferencia y s es la desviación estándar.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Las pruebas de límite tienen como objetivo verificar si la concentración del analito se encuentra por encima o por debajo de un umbral específico. Se llevó a cabo una curva de calibración en un rango de concentración de 0,479 a 1,100 ppm. El límite de detección se establece mediante una estimación estadística expresada como:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 S_{y/x}}{S}$$

Por otro lado, el límite de cuantificación se determina también a través de una estimación estadística expresada de la siguiente manera:

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{S}$$

En esta última, $S_{y/x}$ representa la desviación estándar de la respuesta y S es la pendiente de la curva de calibración. Este análisis resulta ser un aporte significativo para el método de cuantificación de Dipirona, ya que brinda información sobre la sensibilidad del procedimiento y puede ser utilizado como un método potencial para detectar trazas de este principio activo.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DIPIRONA EN UN MEDICAMENTO

Una vez que se desarrolló y validó el método analítico por HPLC, se procedió a cuantificar la cantidad de Dipirona en un medicamento que estaba vigente al momento del análisis.

Para ello, se pesaron y pulverizaron al menos 10 tabletas, obteniendo aproximadamente $\frac{1}{4}$ del peso promedio total. Posteriormente, se realizó el tratamiento de las muestras siguiendo la metodología propuesta. Se prepararon tres muestras que fueron inyectadas por duplicado.

Resultados

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En la Figura 3 se muestra el cromatograma de la muestra, la cual fue preparada a una

concentración de 0,010 mg/mL. Se puede apreciar que no hay interferencias entre los excipientes y el principio activo presentes en la muestra. Además, los tiempos de retención de las corridas cromatográficas son menores a 5 minutos y durante la adecuación del sistema cromatográfico los valores del coeficiente de variación son incluso menores al 2% con lo cual, el sistema se encuentra debidamente apto para ser utilizado.

LINEALIDAD

Al calcular los coeficientes de correlación (R) y determinación (R^2) a partir de las tres curvas de calibración elaboradas, se evidencia una relación lineal adecuada entre las áreas y la concentración en los distintos días de estudio. Los valores de R obtenidos son iguales o superiores a 0,999. Se puede verificar la pendiente de una curva de calibración mediante la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuesta. El factor de respuesta (f) se define como la relación entre la lectura o respuesta y la concentración, y puede considerarse como una aproximación de la sensibilidad de calibración (área del patrón / concentración del analito). El porcentaje del coeficiente de variación de los factores de respuesta (%CV f) no debe exceder el 5%. Estos coeficientes fueron calculados para cada una de las curvas de calibración que se presentan en la Figura 4. Se obtuvo un porcentaje de variación en los factores de respuesta (CV f) inferior al 5% en todas las curvas de calibración, lo que indica una correlación lineal significativa entre las áreas obtenidas y la concentración del analito. Este resultado cumple con el criterio de aceptación para el análisis, lo que demuestra que los resultados son confiables.

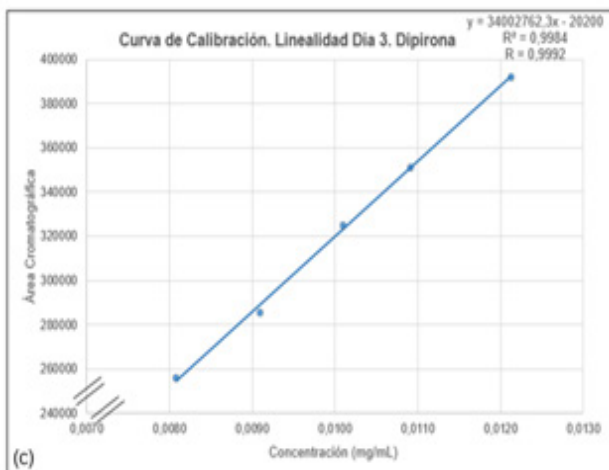
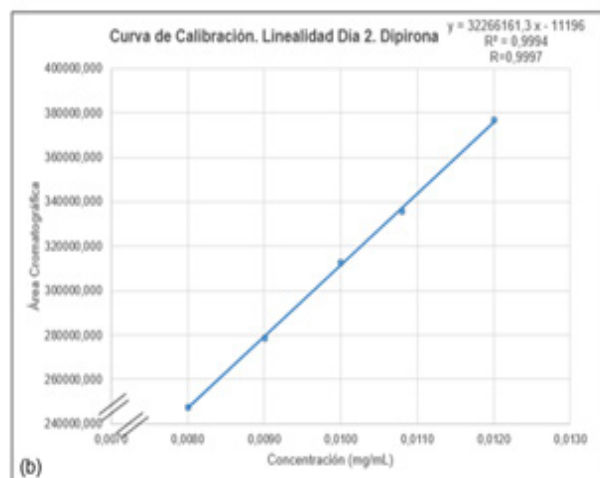
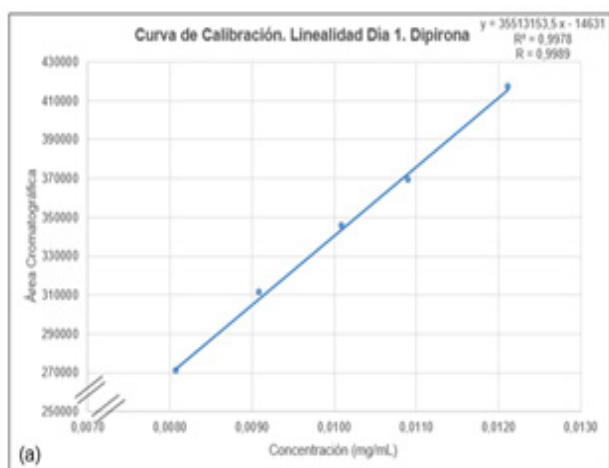


Figura 4. (a) Curva de Calibración Dipirona Día 1 (b) Curva de Calibración Dipirona Día 2 (c) Curva de Calibración Dipirona Día 3

Además, se llevó a cabo un análisis de residuos para identificar cualquier anomalía en la regresión, confirmando que el modelo de calibración utilizado es

adecuado, dado que los errores residuales se distribuyen aleatoriamente. Esto sugiere que el ajuste lineal por mínimos cuadrados para los diferentes días es aceptable y presenta una distribución satisfactoria. En consecuencia, se concluye que la linealidad no fue afectada por la variabilidad en las condiciones operativas y ambientales durante los distintos días de estudio. En la Tabla I se presentan los criterios de aceptación para la linealidad del Dipirona.

Precisión

PRECISIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Se llevó a cabo una evaluación de la precisión del sistema cromatográfico mediante la inyección repetida de una solución patrón que contenía 0,010 mg/mL de Dipirona, realizándose cinco inyecciones. Los resultados revelaron un tiempo de retención (TR) promedio de 4,434 minutos y un coeficiente de variación (CV) de 0,123%. Asimismo, el promedio de las áreas obtenidas fue de 4171,69, con un CV de 1,44%. Los coeficientes de variación tanto para el tiempo de retención como para las áreas del patrón se situaron significativamente por debajo del 2%, lo que indica una conformidad excelente. Esto sugiere que el sistema cromatográfico estaba correctamente configurado y es apto para su uso.

REPETIBILIDAD

La repetibilidad se evaluó mediante la preparación de seis muestras al 100% (0,010 mg/mL), siguiendo las especificaciones del material de referencia previamente descrito. Cada muestra se inyectó por duplicado en el cromatógrafo. A partir de

Tabla I.
Criterios de aceptación para la linealidad de Dipirona

Parámetros de Linealidad	Curva de Calibración		
	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 35513153,5x - 14631$	$y = 32266161,3x - 11196$	$y = 34002762,3x - 20200$
Coefficiente de Correlación (R)	0,9989	0,9997	0,9992
%CV _f	1,05	0,67	1,21

las áreas obtenidas y utilizando una curva de calibración preparada el mismo día, se determinó el valor promedio, el coeficiente de variación de la cantidad de Dipirona (mg/tab) y el porcentaje en relación con lo declarado (Tabla II). La evaluación de la precisión del método a través de la repetibilidad mostró un coeficiente de variación inferior al 2%, lo que indica que la precisión evaluada se encuentra dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Aunque se observaron variaciones en los valores de concentración por tableta en cada día, las concentraciones porcentuales se acercaron significativamente a la cantidad declarada (500 mg de Dipirona), con valores de 107,23 %, 107,46 % y 104,42 % para los días 1, 2 y 3, respectivamente (Tabla III).

Estos porcentajes se encuentran dentro del rango aceptable del 90-110%, lo que indica que el método utilizado es adecuado.

Tabla II.
Precisión del Método para la Determinación de Dipirona

Réplicas	Masa de Muestra (g ± 0,001)	Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Promedio Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Porcentaje Respecto a lo Declarado	%CV
1	156,99	516,5	517,0	103,4	0,1
		517,5			
2	157,04	522,4	524,1	104,8	0,5
		525,7			
3	157,30	532,9	533,2	106,6	0,1
		533,6			
4	157,75	535,5	537,8	107,6	0,6
		540,1			
5	157,56	536,7	536,4	107,3	0,1
		536,0			
6	157,50	532,9	534,3	106,9	0,4
		535,7			
		Promedio	530,5	106,1	
		DE	8,2	1,6	
		%CV	1,5	1,5	

CV= Coeficiente de variación | Tab = tableta

Tabla III.
Precisión Intermedia del método para la determinación de Dipirona

		Dipirona mg/tab	Dipirona mg/tab	Dipirona mg/tab
Réplica de Muestra	Réplica	Día 1	Día 2	Día 3
1	1	535,5	538,5	536,8
	2	540,1	534,4	533,2
2	1	536,7	533,6	514,7
	2	536,0	528,7	515,6
3	1	532,9	548,5	517,2
	2	535,7	543,9	515,1
Promedio		536,2	537,9	522,1
DE		2,3	7,3	10,1
%CV		0,4	1,4	1,9

CV= Coeficiente de variación | Tab = tableta

Además, los coeficientes de variación son inferiores al 2%, sugiriendo que la precisión evaluada a través de la precisión intermedia está dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos.

La precisión intermedia se evaluó utilizando dos enfoques: primero, mediante límites de confianza que indican que el contenido del principio activo está dentro de una probabilidad del 95%, utilizando un valor $t = 4,303$ para 2 grados de libertad a una significancia del 95%. En segundo lugar, se aplicó la ecuación de Horwitz y Albert (2006) para determinar el coeficiente de variación propuesto por estos autores y compararlo con el coeficiente obtenido en el análisis.

El valor promedio fue de 532,08 mg/tab con un coeficiente de variación del 1,63%. Se calculó el coeficiente de variación (CVH) propuesto por Horwitz y Albert utilizando la siguiente expresión:

$$CV_H = 2_{(1-0.5) \log C}$$

Donde C es la fracción del analito en la muestra ($C = \text{g analito/g muestra}$). Se obtuvo

un $CV_H = 0,97$. El coeficiente de variación obtenido se comparó utilizando el parámetro HoRat. El índice de Horwitz (HorRat) es un parámetro de rendimiento normalizado que indica la aceptabilidad de los métodos de análisis con respecto a la precisión entre laboratorios (reproducibilidad), donde $HoRat = CV / CV_H$.

Para Dipirona se obtuvo un $HoRat = 1,68$. Por lo tanto, el método presenta valores aceptables de precisión intermedia, ya que el valor obtenido para el parámetro HoRat es igual o menor a 2, demostrando así que el método es preciso.

ESPECIFICIDAD

Las muestras sometidas a condiciones de degradación forzada fueron analizadas y los resultados se compararon con un patrón y una muestra de control. Con el patrón de 0,01 mg/mL de Dipirona, se observó que el pico correspondiente a la Dipirona eluye a 4,094 minutos.

El cromatograma no presenta especies interferentes, y el ángulo de pureza (PA) es inferior al ángulo del umbral (TH), lo que indica la ausencia de coelución entre el analito de interés y posibles impurezas. En el gráfico de pureza del primer paso (Figuras 5 y 6), el valor de PA es 0,351, menor que TH que es 0,430, lo que confirma que el método puede separar completamente el analito de otras sustancias presentes en la muestra.

Las muestras fueron condiciones de degradación forzada mediante; Fotólisis con exposición a radiación UV a 254 nm durante 7 días; Hidrólisis Ácida con ácido clorhídrico 1N y durante 7 días, protegido de la luz; Hidrólisis Básica con hidróxido

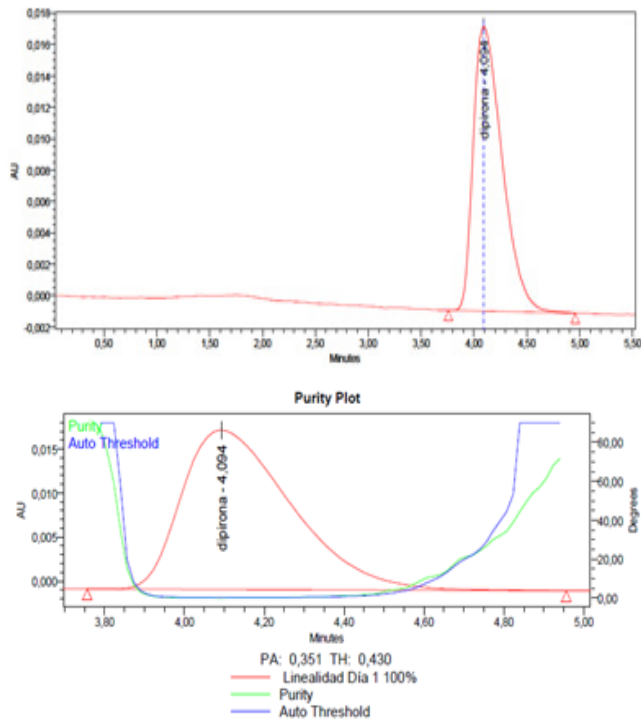


Figura 5. Cromatograma y Gráfico de Pureza de Patrón Control

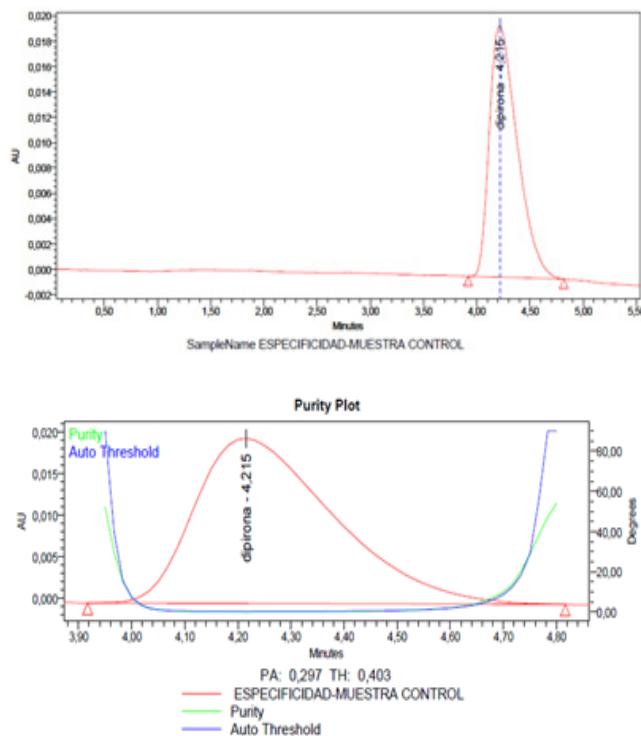


Figura 6. Cromatograma y Gráfico de Pureza de Muestra Control

de sodio por 7 días, resguardado de la luz; Oxidación con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10 % durante 7 días, protegido de la luz; y Termólisis: La muestra fue calentada en un baño de vapor a una temperatura constante de 60 °C durante 1 hora (Figuras 7 al 11). Exceptuando la muestra reanalizada 24 horas después y la degradación forzada por oxidación, el PA en los demás ensayos es menor que TH, lo que sugiere una pureza adecuada. Los resultados obtenidos tras las pruebas de degradación forzada se presentan en la Tabla IV.

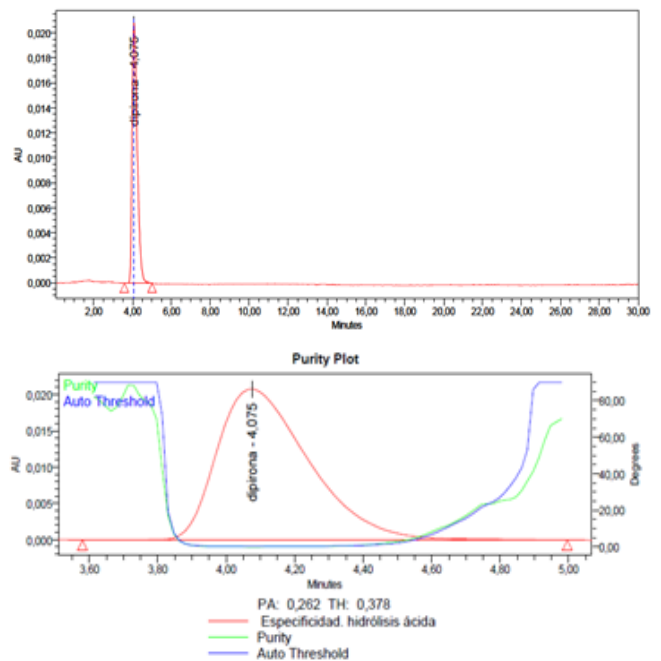


Figura 7. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a hidrólisis ácida por 7 días

En el caso de la degradación forzada por oxidación, se observó una degradación total del analito; la muestra adquirió una coloración verde-amarilla que se mantuvo solo hasta la primera dilución. No se detectó señal alguna de Dipirona, y apareció una nueva señal cromatográfica que eluye a 1,8 minutos. Al comparar esta señal con su espectro de absorción, se encontró un máximo a 229,7 nm, que no corresponde a la Dipirona. Además, el PA fue 0,759,

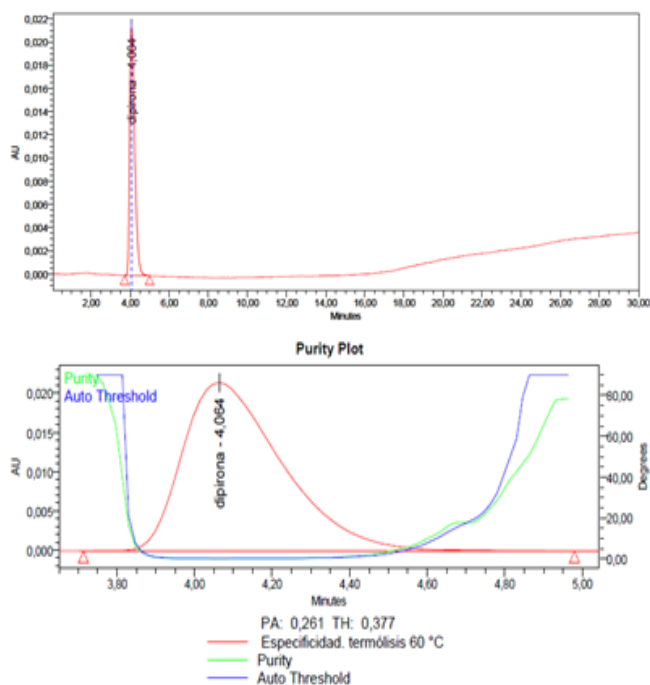


Figura 8. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a termólisis 60°C por una hora

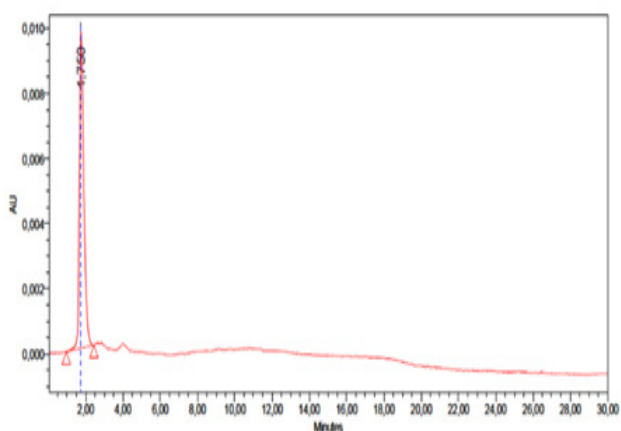


Figura 9. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a estrés oxidativo por 7 días

significativamente mayor que TH (0,454). Esto permite concluir que la Dipirona sufre un proceso de oxidación al añadir peróxido de hidrógeno.

La especificidad del método cromatográfico también fue evaluada bajo las siguientes condiciones: Hidrólisis básica: Se expuso una muestra a 15,00 mL de solución de hidróxido de sodio 3N durante 7 días en condiciones protegidas de luz (Figura 12). Radiación UV: Se expuso una muestra en solución diluyente a radiación UV a 254 nm durante 7 días (Figura 13).

Al finalizar la exposición a hidrólisis básica, se observó una coloración roja intensa que cambió a verde-amarillo tras agregar solución diluyente. El pico correspondiente a la Dipirona eluyó a 4,2 minutos sin evidencias de especies interferentes. Esto se corroboró con un PA menor que TH: PA = 0,311 y TH = 0,414.

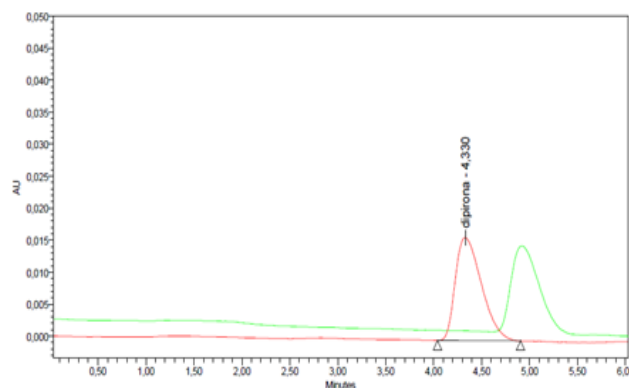


Figura 10. Superposición de cromatogramas muestra control y muestra control a las 24 horas

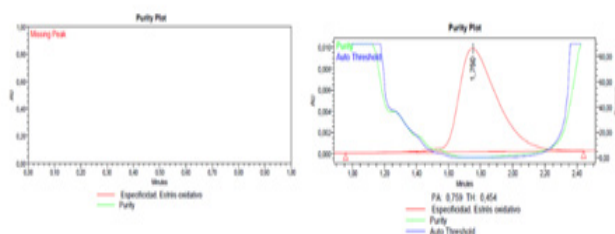


Figura 11. Gráfico de pureza de muestra control 24 horas después de haber sido preparada

Tabla IV.
Especificidad del método para la determinación Dipirona

Condición	PA	TH	Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Porcentaje Respecto al Declarado (%)	Porcentaje de Degradación (%)
Muestra Control	0,297	0,403	535,2	107,1	-----
Muestra Control (reanalizada 24 horas)	0,599	0,433	486,7	97,3	9,7
Fotólisis	0,388	0,403	516,0	103,2	3,8
Hidrólisis ácida	0,262	0,378	517,2	103,4	3,6
Hidrólisis básica	0,336	0,449.	508,9	101,8	5,3
Oxidación	-----	-----	-----	-----	-----
Termólisis	0,261	0,377	514,2	102,9	4,2
Hidrólisis básica	0,311	0,414	480,7	96,1	11,4
Fotólisis (Muestra en Solución)	0,646	0,610	238,1	47,6	59,4

PA= Ángulo de pureza | TH= Ángulo del umbral | % respecto a lo declarado= 500mg/tab

En cuanto a la fotólisis tras 7 días de exposición a radiación UV, el pico de Dipirona también eluyó a 4,2 minutos. Sin embargo, se detectó una señal adyacente al pico principal que eluyó a 5,4 minutos. Comparado con la fotólisis en ausencia de solución diluyente, se observó una disminución en la altura del pico cromatográfico de Dipirona. La especie interferente fue confirmada por un PA mayor que TH: PA = 0,646 y TH = 0,610.

EXACTITUD

Los porcentajes de recuperación de Dipirona se presentan en la Tabla V. Los resultados, expresados como porcentaje de recuperación, se encuentran dentro de los límites aceptables establecidos, que van del 98,0 % al 102,0 % en promedio para cada nivel, conforme a lo indicado por la ICH, con un coeficiente de variación inferior al 2,0%.

Al evaluar la linealidad entre las concentraciones estimadas y reales de

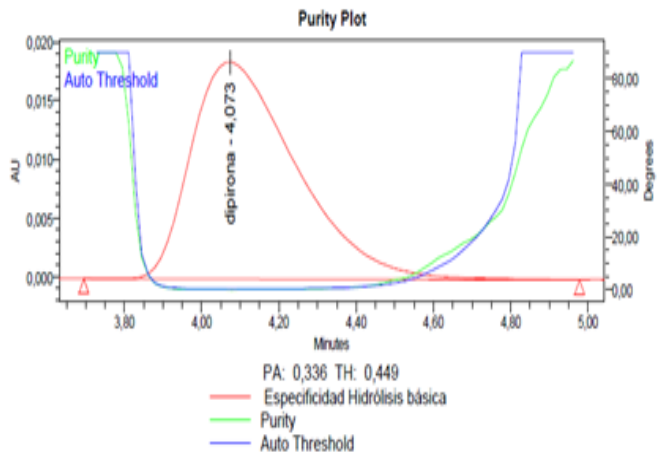
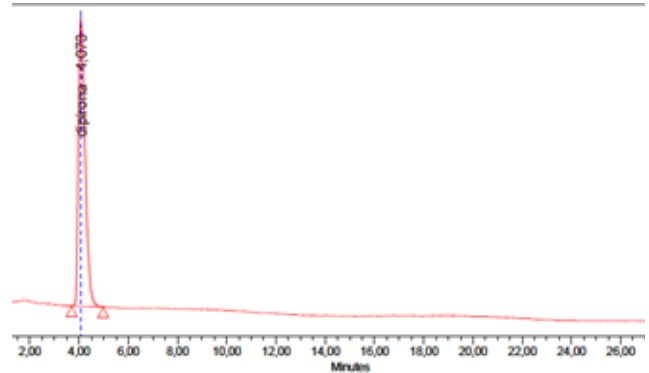


Figura 12. Gráfico de pureza de muestra control 24 horas después de haber sido preparada

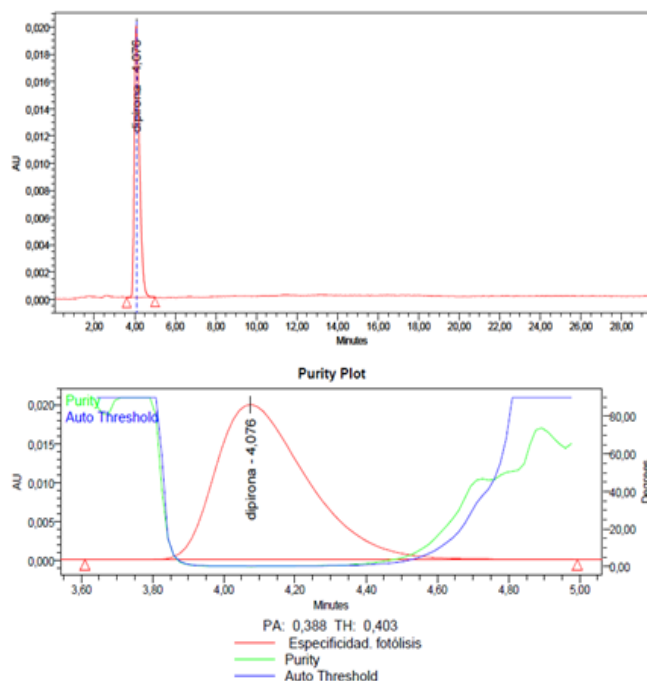


Figura 13. Cromatograma y gráfico de pureza de muestra sometida a fotólisis por 7 días

Dipirona a través de su representación gráfica, se observa que los coeficientes de determinación son notablemente cercanos a uno, con valores superiores a 0,999. Esto indica una relación estrecha entre las concentraciones estimadas y las reales, sugiriendo que los valores estimados son muy similares a los reales. La Figura 14 ilustra la relación entre las concentraciones estimadas y reales (75, 100 y 125%) de Dipirona.

ROBUSTEZ

En la Tabla VI se presenta la interpretación de los resultados relacionados con la robustez, utilizando el modelo de Plackett-Burman. Un diseño de Plackett-Burman (un tipo de diseño de selección) ayuda a descubrir qué factores son importantes en un experimento. Este diseño descarta factores sin importancia (ruido), lo que significa que evita recopilar grandes cantidades de datos sobre factores relativamente poco importantes. Las variables analizadas muestran valores inferiores a $S\sqrt{2}$ (8,72), lo que permite concluir que el método es robusto bajo las tres condiciones evaluadas: pH de la fase móvil, composición de metanol y flujo. Estos hallazgos aseguran que el método analítico puede resistir diversas alteraciones experimentales sin comprometer la determinación del contenido de Dipirona.

LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

La desviación estándar de la respuesta (Sy/x) es de 6070 y la pendiente de la curva de calibración es 26624352. Esto resulta en un límite de detección de 0,75 pp y un límite de cuantificación de 2,28 ppm (Figura 15).

Tabla V.

Exactitud expresada como porcentaje de recuperación de Dipirona

%Recuperación	Promedio	%CV	%Encontrado	Nivel de Concentración
100,23	101,02	2,61	75,77	75
103,96				
98,87				
101,08	99,67	1,43	99,67	100
99,71				
98,22				
101,80	100,85	1,10	126,06	125
99,62				
101,12				



Figura 14. Relación concentraciones estimadas reales (75, 100 y 125%) Dipirona

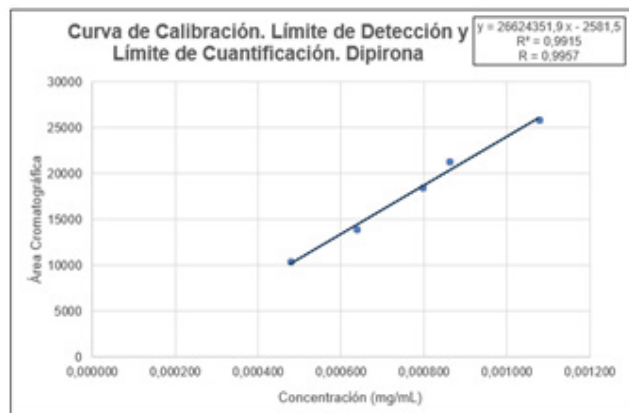


Figura 15. Curva de Calibración LOD y LOQ Dipirona

Tabla VI.

Interpretación de los resultados de la robustez del método según el modelo de Plackett-Burman

Condición	Influencia	Resultado
A	-2,62	Conforme
B	3,54	Conforme
C	2,54	Conforme
AB	-1,74	Conforme
AC	-0,45	Conforme
BC	2,58	Conforme
ABC	-0,23	Conforme

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE DIPIRONA EN UN MEDICAMENTO

En la Tabla VII se muestra los resultados del análisis de un medicamento vigente

en el momento del estudio. Se estableció un criterio de aceptación que requiere que el contenido se encuentre entre el 90% y el 110% respecto a la cantidad declarada por el fabricante. Este cálculo se realiza comparando la cantidad del analito encontrada con la cantidad indicada por el fabricante, expresada como un porcentaje. Todos los resultados se sitúan dentro del rango aceptable. Además, este criterio también cumple con un coeficiente de variación inferior al 2%, lo que indica una alta precisión y confiabilidad en los resultados obtenidos.

Discusión

Se desarrolló y validó un método analítico basado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de dipirona en tabletas. Los parámetros de validación evaluados fueron: Especificidad, Linealidad, Exactitud y la Precisión (Repetibilidad y Precisión intermedia). Los resultados del estudio sobre la linealidad de las curvas de calibración para la Dipirona mostraron coeficientes de correlación (R) superiores a 0,999, indicando una relación lineal ideal entre las áreas medidas y las concentraciones del analito. El coeficiente de variación de los factores de respuesta (%CVf) fue inferior al 5%, lo que respalda la fiabilidad de los datos. El análisis de residuales confirmó que los errores se distribuyen aleatoriamente, sugiriendo que el modelo de regresión lineal es robusto ante variaciones experimentales. En cuanto a la especificidad del método cromatográfico, se observó que el analito se separa completamente de interferentes en condiciones normales, con un ángulo de pureza (PA) de 0,351 frente a un

Tabla VII.
Determinación de Dipirona en un medicamento

Muestra	Réplica	Contenido de Dipirona (mg/tab)	Promedio Cantidad de Dipirona (mg/tab)	Promedio Porcentaje Respecto al Declarado (%)
1	1	492,04	491,66	98,33
	2	491,27		
2	1	490,94	486,88	97,38
	2	482,81		
3	1	492,59	492,22	98,44
	2	491,84		
	Promedio	490,25	490,25	98,05
	DE	3,69	2,93	0,59
	%CV	0,75	0,60	0,60

umbral (TH) de 0,430. Sin embargo, bajo condiciones oxidativas, el PA aumentó a 0,759, indicando degradación y ausencia de Dipirona. En pruebas de hidrólisis y fotólisis, aunque hubo cambios en la coloración, el porcentaje de degradación se mantuvo por debajo del 10%, lo que sugiere que estos productos no interfieren con la medición. La precisión del sistema cromatográfico fue favorable, con un tiempo de retención promedio de 4,434 minutos y un coeficiente de variación (CV) del 0,123% tras inyectar una solución patrón cinco veces. La repetibilidad también se confirmó con un CV menor al 2%. En términos de precisión intermedia, las concentraciones porcentuales se mantuvieron entre 104,42% y 107,46%, dentro del rango aceptable. El análisis mediante el parámetro HoRat arrojó un valor de 1,68. La exactitud del método se reflejó en porcentajes de recuperación entre 98% y 102%, con un CV menor al 2%. Los coeficientes de determinación superiores a 0,999 indicaron una fuerte correlación entre las concentraciones estimadas y reales. La robustez del método fue confirmada mediante el

modelo Plackett-Burman, mostrando que variables como pH y composición no afectan significativamente el análisis. Los límites de detección y cuantificación fueron establecidos en 0,75 ppm y 2,28 ppm respectivamente. Finalmente, al analizar un medicamento vigente, todos los resultados se mantuvieron dentro del rango de aceptación del 90-110% en relación con la cantidad declarada por el fabricante.

Nuestros hallazgos coinciden por lo reportado por Contreras-Roura y col. (2021), quienes realizaron la validación de un método cromatográfico para la valoración del Metamizol sódico en la Dipirona-600 y el Espasmoforte (Dipirona inyectable) indicando que dicho método cumplió con los criterios de aceptación para cada parámetro de validación o desempeño evaluados y se empleó en el análisis de varios lotes de Dipirona-600 y un lote de Espasmoforte.

Los resultados demuestran que el método analítico es adecuado para el análisis rutinario y estudios de estabilidad

en tabletas que contienen Dipirona, asegurando así su calidad y seguridad para los pacientes.

Conclusiones

Se ha desarrollado un método analítico basado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de dipirona en tabletas, logrando una separación efectiva con un factor de capacidad (K') de 1,300 y un tiempo de análisis de aproximadamente 4 minutos. Este método presenta linealidad en el rango de 0,008 a 0,0120 mg/mL ($R^2 \geq 0,999$) y es selectivo, permitiendo identificar y cuantificar el analito sin interferencias significativas. La precisión es alta, con un coeficiente de variación inferior al 2% y recuperaciones entre el 98% y el 102%. Además, se considera robusto bajo condiciones específicas de metanol, pH y flujo. Los límites de detección y cuantificación son 0,75 ppm y 2,28 ppm, respectivamente. La validación del método asegura su aplicabilidad en análisis rutinarios y control de calidad, cumpliendo con los criterios establecidos y garantizando resultados fiables. Se recomienda evitar la inyección de muestras más de 24 horas después de su preparación para prevenir impurezas.

Agradecimientos

Los autores agradecemos el apoyo brindado por los miembros del Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y la Fundación María Paula Alonso de Ruiz Martínez.

Referencias Bibliográficas

- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2005, Real Farmacopea Española. España.
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2013. Farmacopea Argentina. 7. Argentina.
- Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. 2010. Farmacopeia Brasileira. Brasilia.
- Buitrago-González TP, Calderon-Ospina CA, Vallejos-Narvaez, A. 2014. Dipirona: ¿Beneficios subestimados o riesgos sobredimensionados? Revisión de la literatura. *Rev Colomb Cienc Quim Farm* 43(1):173-195.
- British Pharmacopoeia Commission. 2020. British Pharmacopoeia.
- Chinesse Pharmacopoeia. 1990. Chinese Chemical Engineering Press. Beijing.
- Contreras-Roura J, Guach-Wilson S, Pérez-Martiatu S, Lafferte-García T, Hernández-Fernández Y. 2021. Validación de un método cromatográfico para la valoración del Metamizol sódico en la Dipirona-600 y el Espasmofoorte. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 52(2): 161-181.
- Davrieux M, Gutiérrez S, Marín D, Pier D, Pais T. 2007. Agranulocitosis por dipirona: a propósito de un caso clínico. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 78(1):35-40.
- Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 42. Validación de Procedimientos Farmacopeicos. 2019.
- Horwitz W, Albert RJ. 2006. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *Assoc off Anal Chem* 89(4):1095-1109.
- International Conference Harmonisation (ICH) Harmonised tripartite guideline - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); London, 2005.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. 2014. Compendium of Chemical Terminology (Gold Book). Versión 2.3.3. pp. 274-275.
- Machado-Alba J, Cardona-Trejos E, Sánchez-Morales L, Rodríguez-Ramírez, L. 2019. Identificación de reacciones adversas medicamentosas en pacientes tratados con dipirona en un hospital de tercer nivel. *Ces Medicina* 33:13-20.
- Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Buenos Aires.

Disponible: file:///C:/Users/aster/Downloads/introduccion-a-la-hplc-aplicacion-y-practica-o-a-quattrocchi-s-a-de-andrizzi-r-f-laba_compress.pdf.

Tomidis Chatzimanouil MK, Goppelt I, Zeissig Y, Sachs UJ, Laass MW. 2023. Metamizole-induced

agranulocytosis (MIA): a mini review. Mol Cell Pediatr. 10(1):6.

USP 42. Apartado 1225. 2023. Validación de Procedimientos Farmacopeicos. Disponible: <https://es.scribd.com/document/681322145/USP-1225-Validacion-de-Metodologia>

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.