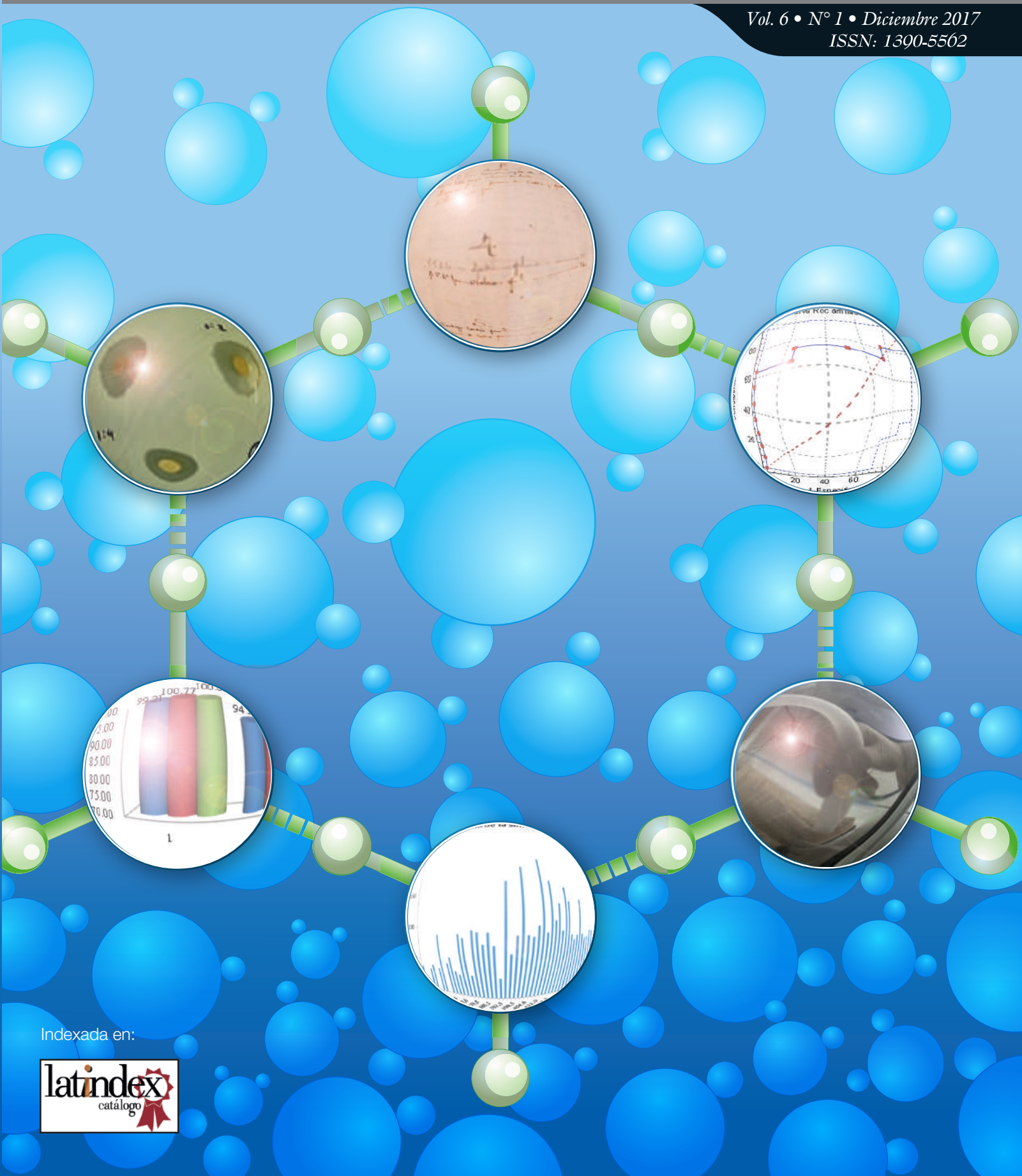


Química Central



Revista de la Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador

Vol. 6 • Nº 1 • Diciembre 2017
ISSN: 1390-5562



Indexada en:



CONTENIDOS

Presentación	1
Formulación de una solución antifúngica para la Preservación del Archivo Histórico de la Universidad Central del Ecuador	2
<i>Marcelo D. Campués Ordoñez, Liliana Naranjo, Javier Rodrigo Santamaría Aguirre, Natasha Sanmartín, Trosky Yanez, Pablo Bonilla</i>	
Utilidad de amilasa y lipasa en diagnóstico y tratamiento de dolor abdominal agudo	11
<i>Marco Fuel Herrera, Gabriela Gualpa Jácome, Inés Echeverría Llumipanta</i>	
Nanoazitromicina preparada por el método solvente/antisolvente: efecto sobre la disolución	21
<i>Jonathan Diego Hurtado Jarrín, Javier Rodrigo Santamaría Aguirre</i>	
Influencia del extracto de Chamana (<i>Dodonaea viscosa</i>) en la estabilidad de jarabe de Vitamina C	27
<i>Mireya Medina, Dayana Borja</i>	
Isoconversión Isotermal para una estimación rápida de la vida útil de comprimidos de Ácido acetyl salicílico	37
<i>Paúl Andrés Esparza Naranjo, Robert Martin Alcocer Vallejo, Javier Rodrigo Santamaría Aguirre</i>	
Determinación de la eficiencia de un producto fijador para la protección de tintas ferrogálicas	49
<i>Ariel Vizcaíno, Trosky Yánez, Pablo Bonilla</i>	
Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de microalgas usando cepas ATCC	57
<i>Jennifer Suasnavas, Ronny Flores, Inés Echeverría</i>	
Instrucciones para los autores	67

QUÍMICA CENTRAL

QUÍMICA CENTRAL (ISSN 1390-5562 física, ISSN 2477-9121 electrónica), Volumen 6, Número 1, diciembre 2017. Revista científica bianual de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja el punto de vista de la Facultad de Ciencias Químicas. Química Central está indizada en el catálogo Latindex, Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Tiraje: 500 ejemplares. Química Central también se publica electrónicamente bajo licencia Creative Commons. Dirección: Instituto de Investigación y Postgrado, Calle Jerónimo Leyton (detrás del Hospital del Día), Ciudadela Universitaria, Quito. Teléfonos: (593 2) 3216 975 / 2523 710 / 2500 409. Apartado postal: 17-03-1369, Quito-Ecuador. Revisión de Abstract en inglés por el Instituto Académico de Idiomas de la UCE.

Sitio Web:

<http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/QUIMICA/issue/archive>

Correo electrónico:

revista.fcq@uce.edu.ec

ISSN: 1390-5562

Diseño e Impresión:

Editorial Universitaria

EDITORIAL

Ha transcurrido casi dos años desde que se publicó el último volumen de la revista. La vieja aspiración de publicarla semestralmente se dificulta por diversas razones: financieras, burocráticas, de producción científica. Sin embargo, no perdemos la esperanza de que se regularice la edición semestral de la revista cuya naturaleza es eminentemente científica y académica.

A partir del relanzamiento de QUÍMICA CENTRAL en el mes de abril de 2010, las universidades ecuatorianas han experimentado varias transformaciones como resultado del nuevo marco legal y normativo que arranca con la expedición de la nueva Constitución de la República en el año 2008. El Reglamento de Régimen Académico establece como uno de sus objetivos “regular la gestión académica-formativa en todos los niveles de formación y modalidades de aprendizaje de la educación superior, con miras a fortalecer la investigación, la formación académica y profesional, y la vinculación con la sociedad”. Concomitantemente, la difusión de los resultados es uno de los principales objetivos de la investigación en la universidad, y la publicación de los resultados originales en revistas indexadas con revisión por pares, como es QUÍMICA CENTRAL, se considera uno de los mejores modos de difundir el conocimiento.

En esta edición se publican siete artículos de investigación científica y tecnológica que presentan resultados originales en el campo de las ciencias químicas en sus diferentes áreas temáticas.

A. Vizcaino, T. Yáñez y P. Bonilla investigaron sobre la formulación y evaluación de un fijador alternativo de tintas ferrogálicas utilizado para proteger documentos patrimoniales; J. Suasnavas, R. Flores e I. Echeverría evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de microalgas recolectadas en la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado; M. Campués, L. Naranjo, J. Santamaría, N. Sanmartín, T. Yáñez y P. Bonilla investigaron la formulación de una solución antifúngica para la preservación documental del archivo histórico de la Universidad Central del Ecuador; P. Esparza, R. Alcocer y J. Santamaría estudiaron la isoconversión isotermal de comprimidos de ácido acetil salicílico para una estimación rápida de su vida útil; M. Fuel, G. Gualpa e I. Echeverría evaluaron la utilidad de la amilasa y lipasa sérica en el diagnóstico y control de tratamiento de pacientes con dolor abdominal de origen pancreático y no pancreático; J. Hurtado y J. Santamaría desarrollaron una nanosuspensión de azitromicina y estudiaron la influencia de la temperatura del medio de dispersión con el objeto de mejorar su velocidad de disolución; M. Medina y D. Borja investigaron la influencia de la capacidad antioxidante que presenta el extracto de Chamana (*Dodonea viscosa*) sobre la estabilidad de un jarabe de vitamina C.

Todos estos artículos fueron sometidos a una rigurosa revisión por los pares académicos y el Consejo Editorial, en procura de mantener el prestigio editorial que ha alcanzado la revista en su corto tiempo de vida. Reiteramos la invitación a todos los académicos e investigadores de las ciencias químicas del país y de otras latitudes, a presentar sus artículos para su publicación en el próximo volumen.

Consejo Editorial

Formulación de una solución antifúngica para la Preservación del Archivo Histórico de la Universidad Central del Ecuador

MARCELO D. CAMPUÉS ORDOÑEZ¹, LILIANA NARANJO¹, JAVIER RODRIGO SANTAMARÍA-AGUIRRE^{1*},
NATASHA SANMARTÍN², TROSKY YANEZ¹, PABLO BONILLA¹

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito.,

²Área Histórica, Archivo Histórico, Universidad Central del Ecuador, Quito.

*Correspondencia: jsantamaria@uce.edu.ec

Recibido: 2 octubre 2016, Aceptado: 30 agosto 2017

Resumen

La conservación documental en los últimos años cumple un rol importante en la sociedad, debido a que trata de recuperar la memoria histórica y el acervo documental de la misma. Uno de los problemas de mayor incidencia y dificultad es la presencia de hongos y sus productos metabólicos en los documentos, ya que potencialmente ocasionan la pérdida total de la información dificultando de esta forma los procesos de restauración. El presente estudio busca formular una solución para tratar esta contaminación de hongos, con el uso de fluconazol como agente antifúngico. Se inició aislando los hongos presentes en los libros, seguido del uso del Diagrama pseudoternario para la formulación de la solución de Fluconazol, y por último, se evaluó la eficacia de esta formulación por técnicas microbiológicas modificadas, obteniéndose de esta manera, una reducción porcentual de Unidades Formadoras de Colonias de hongos mayor al 90%, mediante la nebulización de una solución de Fluconazol al 24% compuesta por una mezcla de cosolventes: Agua: 20%, Metanol: 50%, Etanol: 30%, con un tiempo de aplicación de 15 minutos.

Palabras clave: Conservación documental, Fluconazol, Solución antifúngica, Nebulización.

Formulation of an antifungal solution for the preservation of the historical archive of the Central Ecuador University

Abstract

The documentary conservation in recent years plays an important role in society, because it tries to recover the historical memory, and the documentary acquires it. One of the most prevalent and difficult problems is the existence of fungi and its metabolic products in documents, as it potentially causes a total loss of information, hindering the restoring process as well. The study seeks to formulate a solution to treat this fungal contamination, using Fluconazole as an antifungal. We started by isolating fungi found in the books, followed by the use of the pseudo-ternary diagram for the formulation of the solution of Fluconazole, and finally the effectiveness of this formulations was evaluated by using modified microbiological techniques, obtaining a percentage reduction on CFU of 90%, by nebulization a solution of Fluconazole at 24% and co-solvents: Water: 20%, Methanol: 50%, Ethanol: 30%, during 15 minutes.

Keywords: Documentary conservation, Fluconazole, Antifungal solution, Nebulization.

1. Introducción

Los Centros documentarios o reservas históricas vienen cumpliendo un papel fundamental dentro de la sociedad, pues aportan a la comunidad mediante, la gestión de acciones, la educación, el desarrollo cultural, la toma de decisiones, la transparencia en las acciones administrativas, los avances en la educación, la cultura e investigación. A ellos se han venido vinculando profesiones de diferentes campos aportando a la conservación y preservación de los centros documentarios.

En la actualidad se da importancia al rescate de los documentos bibliográficos de las áreas Históricas, y son varios proyectos de conservación documental, que se han visto limitados al tratamiento tradicional de los documentos físicos, sin promover nuevos estudios científicos en este campo. En este contexto es que se han detectado varios problemas, siendo uno de los más importantes los agentes fúngicos que afectan a las fuentes bibliográficas físicas y sus espacios.[1]

El Área Histórica de la Universidad Central del Ecuador cuenta con un acervo documental inmenso, contiene alrededor de 30.000 libros y documentos del fondo antiguo de la Universidad que están comprendidos entre los años 1485 y 1960, abarcado un período de cinco siglos.

Entre los tratamientos tradicionales para la restauración de libros se encuentra el uso de ciertas técnicas para la eliminación de hongos siendo las más predominantes: el uso de atmosferas de dióxido de carbono y el tratamiento por congelación al vacío.

Los hongos son organismos eucariotas típicos que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica, participando en los distintos ciclos biológicos. Los hongos presentes en documentos bibliográficos se los encuentra en forma de esporas y eucariotas desarrollados. El tipo y la extensión de estos contaminantes fúngicos depende de las características del libro como de las condiciones ambientales a las que se encuentre el mismo. Entre las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento se encuentran: una alta humedad (40%), temperatura ambiental (21 °C), poca cantidad de luz, y baja circulación de aire.[2]

Los antimicóticos son fármacos que tienen la capacidad de evitar el crecimiento de hongos e incluso provocar la muerte de los mismos, por lo que se usan para tratar distintas enfermedades en humanos. El Fluconazol es un agente antimicótico de amplio es-

pectro, comúnmente usado en tratamientos debido a sus excelentes propiedades fisicoquímicas y su escasa toxicidad.[3]. A la fecha no se han encontrado estudios de Fluconazol en superficies inertes.

Una herramienta utilizada para formular soluciones de fármacos por cosolvencia es el diagrama pseudoternario en el que cada uno de los componentes puros están representados en cada vértice y pueden ser expresados mediante % peso/peso o Molaridad. La suma de los tres componentes debe llegar a 100%. [4]

El objetivo principal de esta investigación fue formular una solución anti fúngica capaz de eliminar los hongos presentes en los libros sin alterar sus características físicas, para lo cual en primera instancia se aislaron e identificaron los hongos presentes en los libros del Archivo Histórico de la Universidad Central de Ecuador, para luego formular una solución anti fúngica usando Fluconazol, y al final evaluar la eficacia de estas soluciones formuladas.

2. Parte Experimental

Equipos y Materiales: Para el aislamiento de los hongos se utilizó como medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar, para la identificación de los mismos se observó su estructura y morfología con el uso de un microscopio (Lumin) y las técnicas de tinción Gram para bacterias y el reactivo de Azul de Lactofenol para hongos. La incubadora que se utilizó fue Gemmyco Digital # IN-601. Durante la elaboración de las Formulaciones se utilizó como materia prima Fluconazol, Etanol (96%), Metanol técnico (USP), Agua destilada tipo 2. En la valoración del Fluconazol se utilizó un espectrofotómetro UV -VIS (HACH). Para la esterilización de todo el material se usó un autoclave vertical (BIOBASE), y se trabajó todo el procedimiento microbiológico en un cabina de flujo laminar (Flow 85V). Para la aplicación de las soluciones se utilizó un nebulizador (TF01), con capacidad de 2,2 L y tasa de evaporación 250 mililitros por hora.

Métodos de valoración de la materia prima Fluconazol: Se utilizó el método espectrofotométrico descrito en la Farmacopea Brasileña 2010 [5], la cual brevemente describe que se debe pesar un equivalente a 100 mg de Fluconazol en un matraz 100 mL. Añadir 70 mL de ácido clorhídrico 0,1 M, dejar en ultrasonido durante 10 minutos, aforar con el mismo disolvente, homogenizar y filtrar. Tomar 10 mL de esta solución y diluir con ácido clorhídrico 0,1 M en un matraz aforado de 50 mL hasta alcanzar una concentración de 0,02% (p/v). Leer en el espectrofotómetro a 261 nm. Este procedimiento se realiza para la muestra y estándar.

Análisis microbiológico del aire por sedimentación en placa: Este método se aplica en las áreas de almacenamiento del Área Histórica, donde en primer lugar se evalúa las áreas con mayor riesgo de contaminación a ser evaluadas, luego con las cajas Petri destapadas se colocan boca arriba y se las deja por 3 horas, al cabo de este tiempo se cierran las cajas y se incuban durante 7 días a 37°C. Se cuentan las colonias formadas y se reportan los datos respectivos[6].

Análisis de superficies no planas (libros) por hisopado: Se utilizó la técnica modificada descrita en [6], donde se coloca una plantilla 5x5 sobre la superficie a ser muestreada, con la ayuda de un hisopo estéril se fricciona sobre la superficie del libro en todas las direcciones, se coloca dentro de un tubo estéril que contiene 10 ml de solución salina y se agita enérgicamente por 1 minuto y luego se lo deja reposar 15 minutos, se siembra por extensión 0,1 ml de la solución en cajas Petri, se incuban a 37 °C por 7 días y se cuenta las colonias formadas.

Identificación de hongos por la prueba de azul de Lactofenol: Se toma una fracción de las colonias aisladas a ser identificadas, con la ayuda de una asa microbiológica y cinta adhesiva de 1 cm x 1 cm pegada al extremo del asa, con la superficie adhesiva tocar la parte superior de la colonia, colocar una gota de azul de Lactofenol en el porta objetos y pegar la cinta adhesiva sobre él, colocar una nueva gota sobre la cinta y cubrir con el cubreobjetos, Observar a 40x en el microscopio.[6]

Preparaciones de las soluciones antifungicas: Para la preparación de cada solución, se pesa la cantidad de Fluconazol correspondiente a la proporción

del diagrama pseudoternario, se miden los volúmenes de etanol, metanol y agua de acuerdo al mismo diagrama, con la ayuda de un agitador magnético mezclar el metanol, etanol y agua con agitación constante y a temperatura ambiente, luego con la ayuda de una espátula colocar poco a poco el Fluconazol en la mezcla hasta observar una completa disolución.

Análisis de la eficacia antifúngica de las soluciones de Fluconazol: Esta técnica se realizó mediante el método de muestreo en superficies irregulares con hisopo descrito anteriormente, antes y después de la nebulización de las distintas soluciones. Para lo cual de los libros presuntamente contaminados con hongos: 190 se tomó una muestra representativa con la Tabla Militarizada Estándar en un nivel de inspección N-2 obteniéndose 32 libros elegidos completamente al azar. A continuación sobre las hojas de un libro elegidas aleatoriamente se realiza el muestreo, se aplica la nebulización por el tiempo estimado en el diseño experimental y luego se realiza el muestreo final inmediatamente concluida la nebulización en las mismas hojas, el ensayo se realiza por triplicado, en tres hojas diferentes del mismo libro.

Diseño experimental: El diseño experimental se realizó para la eficacia anti fúngica y consiste en un Diseño Factorial Multivariable Completamente al Azar, con 2 Factores: Soluciones de Fluconazol, con 3 niveles y Tiempo de Aplicación, con dos niveles; con 3 repeticiones por cada ensayo siendo un total de 18 tratamientos realizados, midiendo como variable respuesta la reducción porcentual de UFC de hongos, analizados mediante un análisis de varianza y Optimización de Respuesta.

3. Resultados y Discusión

Microorganismos aislados por muestreo en el aire

Tabla 1. Microorganismos aislados por muestreo de aire.

Área de Riesgo	Promedio de Unidades Formadoras de colonias por caja (UFC/caja)	Identificación
Área Cuarentena	25	<i>Aspergillus sp, Penicillium sp.</i>
Pasillo General del Área Histórica	2	<i>Aspergillus sp.</i>
Sala de Extracción de Aire	15	<i>Aspergillus sp, Penicillium sp.</i>
Archivo Histórico	6	<i>Aspergillus sp, Penicillium sp.</i>

Como se puede observar en la Tabla 1 las familias más predominantes en el aire de la instalación del Área Histórica son dos: *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*. Se observa

también que las áreas más contaminadas son La sala de Cuarentena y la de Extracción de Aire, por lo que los libros ubicados en estos sitios son lo más contaminados.

Microorganismos aislados por muestreo en libros contaminados

Tabla 2. Microorganismos aislados por muestreo en libros

Numero de Libros	Año de Publicación	Promedio de Unidades Formadoras de Colonias UFC / cm ²	Identificación
5	1500	25	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
11	1600	64	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
6	1700	6	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
6	1800	12	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>
4	1900	9	<i>Aspergillus sp, Penicilliumsp.</i>

Como se puede observar en la Tabla 2 las familias más predominantes en las hojas de los libros son dos: *Aspergillus sp*, y *Penicillium sp.*, coincidiendo con los aislados en el aire. El número de hongos aislados es mayor en los siglos 1500 y 1600 debido

probablemente a la elevada cantidad de celulosa que se usaba para realizar libros en esa época. [7]

Las características morfológicas y microscópicas de las dos familias obtenidas son:

Tabla 3. Caracterización de los hongos aislados.

Familia	Descripción	Microscópica
<i>Penicillium</i>	Colonias aterciopeladas elevadas de color verde-gris.	Conidióforos rectos y hialinos, Conidias en cadena, esféricas y hialinas
	Colonias elevadas pulverulentas de color blanco	
<i>Aspergillus</i>	Colonias planas pulverulentas de color verde	Conidioforos hialinos de pared rugosa, Cabezuela radiada, biseriada, Conidias equinuladas, esféricas

Las características descritas en la Tabla 3 coinciden con la bibliografía [8], tanto en observación macroscópica: la forma, el color; la apariencia de los hongos, como en la observación microscópica hifas, conidios, micelios.

Formulación de la solución antifúngica

Una vez que se identificaron las familias de hongos presentes en los libros se seleccionó al Fluconazol como mejor alternativa para el tratamiento de los

mismos, debido a su alta solubilidad, menor grado tóxico y amplio espectro de acción[9]. La comparación de la gran mayoría de agentes anti fúngicos. La solución a ser el vehículo del Fluconazol debía cumplir ciertas condiciones como: no mojar excesivamente las hojas del libro, disolver la mayor cantidad posible de Fluconazol, y tener la capacidad de

nebulizar, seleccionándose así como solventes: Etanol, Metanol y Agua [10]. La proporción adecuada de los solventes se determinó usando un diagrama pseudoternario, en donde se tomaron en una primera etapa 19 puntos y luego en una segunda etapa 10 puntos en la zona con mejores resultados obteniéndose así la Figura 1:

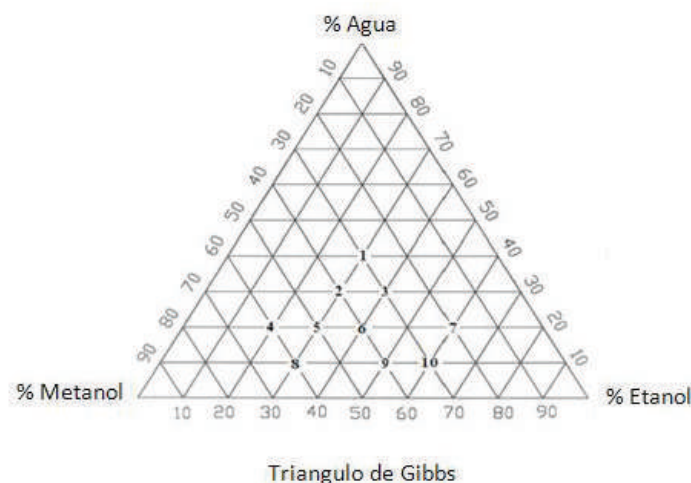


Figura 1. Diagrama pseudoternario con los 10 mejores resultados de % solubilidad, nivel de nebulización y daño físico perceptible

Una vez que se determinó el porcentaje disuelto de Fluconazol de cada una de las combinaciones se obtuvo la siguiente Tabla 4:

Tabla 4. Elección de las proporciones adecuadas de los solventes.

N-	% Agua	% Etanol	% Metanol	% Fluconazol disuelto	Apreciación de las gotículas de Nebulización	Apreciación de la Humedad del libro
1	40	30	30	13	Alta	Poca
2	30	30	40	16	Alta	Poca
3	30	40	30	15	Alta	Poca
4	20	20	60	22	Media	Ninguna
5	20	30	50	24	Media	Ninguna
6	20	40	40	23	Media	Ninguna
7	20	60	20	20	Media	Ninguna
8	10	30	60	24	Baja	Ninguna
9	10	50	40	27	Baja	Ninguna
10	10	60	30	30	Baja	Ninguna

Como puede observarse en la Tabla 4, los puntos 5, 9, y 10 son los que presentan mayor proporción de Fluconazol disuelto, una nebulización aceptable e imperceptible humedad sobre la hoja del libro (Figura 2). A las tres soluciones se evaluó la eficacia antifúngica.

Evaluación de la eficacia de las soluciones antifúngicas

Para cada tipo de formulación y a cada tiempo determinado de acuerdo al diseño, se evaluó la eficacia expresada como reducción porcentual mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ No Reducido} = \frac{\frac{ufc}{cm^2} \text{ final}}{\frac{ufc}{cm^2} \text{ inicial}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Reducido} = 100\% - \% \text{ No reducido} \quad (1)$$

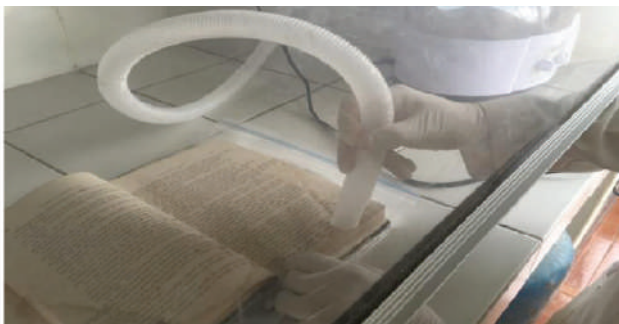


Figura 2. Aplicación de la solución B nebulizada sobre el libro

De esta forma se obtuvieron los siguientes datos (fig 3):

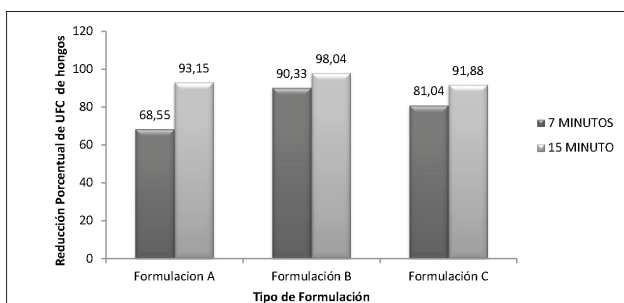


Figura 3. Comparación de la reducción porcentual de UFC de Hongos de las Formulaciones A, B y C a diferente tiempo de aplicación.

Como se puede observar en la Figura 3, la reducción porcentual de UFC de Hongos de la Formulación B (20% Agua: 30% Etanol: 50% Metanol), es mayor que la reducción porcentual de la Formulación A (10% Agua: 50% Etanol: 40% Metanol) y C (10% Agua: 60% Etanol: 30% Metanol) a los dos tiempos de aplicación 7 y 15 minutos, esto quizás se deba a que la Formulación B

tiene más cantidad de agua con lo que la nebulización mejora y hay mayor contacto de la solución con el libro.

Las concentraciones de Fluconazol aumentan cuando existe mayor cantidad de metanol y Etanol (Formulación A y C), pero disminuye el Nivel de Nebulización, esto se ve afectado en la reducción porcentual de UFC de Hongos de los mismos.

También se evaluó el efecto matriz de la mezcla de co-solventes, sin encontrar ningún efecto fungicida sobre los hongos aislados.

Análisis estadístico de la Eficacia de las soluciones de Fluconazol

Optimización de la Respuesta

Esta técnica ayuda a identificar los valores más probables de las variables que, en combinación, optimizaron una Reducción Porcentual de UFC del 100%. Se tomaron las medias de cada repetición de los dos factores resumidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Datos Experimentales para el diseño Factorial

Factor 1	Factor 2 (Tiempo de aplicación)	
	7 minutos	15 minutos
Formulación A	65,57 %	92,69 %
	65,18 %	93,12 %
	74,92 %	93,69 %
Formulación B	90,66 %	98,32%
	89,96 %	98,24%
	90,37 %	97,57%
Formulación C	77,79 %	92,01%
	81,38 %	92,35%
	83,95%	91,29%

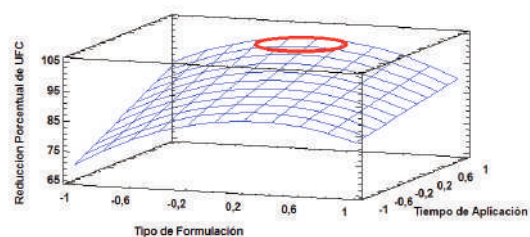


Figura 4. Optimización de Superficie de Respuesta del Tiempo de Aplicación y el Tipo de Formulación.

El círculo que muestra la Figura 4 señala el área con mayor Reducción Porcentual estimada. Con valores que representan las Formulaciones A, B, y C (valores de 1 a -1) y en Tiempo de Aplicación de 7 a 15 minutos, Obteniéndose así una Reducción Porcentual Estimada del 100% con la formulación B y 15 minutos para el tiempo de Aplicación.

4. Conclusiones

Se identificó mediante técnicas de aislamiento microbiológicas (muestreo de aire y muestreo de superficies por hisopado), dos familias principales de hongos presentes en los libros del Área Histórica: *Aspergillus* y *Penicillium*.

Se determinó las proporciones adecuadas de la mezcla de solventes, mediante el diagrama pseudoternario, necesarias para obtener la mayor solubilidad de

principio activo (Fluconazol), una nebulización aceptable, y una eficacia antifúngica adecuada para poder remplazar a los tratamientos comúnmente usados, encontrándose así que la proporción con la que se obtuvo Reducciones Porcentuales de UFC de Hongos mayores al 90% fueron: Agua: 20%: Metanol 50%: Etanol 30%.

Se determinó que existe un efecto estadísticamente significativo del tiempo de aplicación y del tipo de formulación concluyendo que a mayor tiempo de aplicación existe una mayor eficacia de las soluciones y que la composición de las mismas influye directamente en la eficacia de las soluciones.

Se identificó mediante la técnica de Optimización de respuesta que la mejor combinación para obtener Reducciones porcentuales de UFC de hongos de 100% es la Formulación B y el Tiempo de aplicación de 15 minutos.

Referencias

- [1] SanMartín, N. (2015). Proyecto de Recuperación de la Memoria Histórica y Conservación del Acervo, Quito: UCE.
- [2] Aristegui, B. (2002). El reino de los hongos. Revista Iberoamericana de Micología, 2,3.
- [3] Biasoli, M. (05 de 2013). Estructura y actividad de antifungicos. Recuperado el 20 de 07 de 2015, de <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4130/course/section/1519/Estructura%20y%20actividad%20de%20los%20antifungicos.pdf>
- [4] Selvaduray, G. (2004). Ternary phase diagrams. California.
- [5] Farmacopea; Brasileña. (2010). Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Obtenido de http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm.
- [6] Teran, R. (2015). Manual de Laboratorio de Micorbiología Farmacéutica. Quito.
- [7] Marcowist, B. (1990). How to prevent and remove mildew. Washington: Government Printing.
- [8] Tangafire, V. (2011). UDEA. Obtenido de: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100812>
- [9] Avendaño, C. (2001). Introducción a la química farmacéutica (2a. ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
- [10] USP32-NF27. (2009). The United States Pharmacopeial The National Formulary. (32a. ed.).

Utilidad de amilasa y lipasa en diagnóstico y tratamiento de dolor abdominal agudo

MARCO FUEL HERRERA^{1*}, GABRIELA GUALPA JÁCOME^{1,2}, INÉS ECHEVERRÍA LLUMIPANTA¹.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador.

²Laboratorio Clínico Northospital, Av. De la Prensa y Vaca de Castro, Quito-Ecuador

*Correspondencia: marco_ofh_@hotmail.com

Recibido: 04 de abril de 2017, Aceptado: 15 de diciembre de 2017

Resumen

El objetivo del trabajo de investigación fue evaluar la utilidad de la amilasa y lipasa sérica en el diagnóstico y control de tratamiento de pacientes con dolor abdominal agudo de origen pancreático y no pancreático que acudieron al Hospital NORTHOSPITAL de Quito durante el periodo comprendido entre octubre a diciembre del 2015 y que presentaron valores elevados de amilasa y lipasa sérica. Las variables edad, sexo, antecedentes patológicos y familiares, motivo de consulta, signos y síntomas, pruebas de laboratorio e imagen, diagnóstico y tratamiento fueron obtenidas de las historias clínicas. Para el tratamiento estadístico se emplearon herramientas como: media, frecuencia, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), curvas ROC, prueba t para muestras relacionadas y ANOVA de un factor. Utilizando pruebas estadísticas de rigor se evidenció que la lipasa sérica presenta una mayor sensibilidad (90,91%) frente a la amilasa (63,3% de sensibilidad) para el diagnóstico de pancreatitis. Ambos parámetros bioquímicos ofrecen un 100% de especificidad. La amilasa y lipasa sérica se elevan en el curso de una pancreatitis aguda y en otras patologías no pancreáticas, por lo tanto se precisa de otros exámenes de laboratorio y pruebas de imagen para lograr un diagnóstico eficaz.

Palabras claves: Dolor abdominal agudo, pancreatitis, amilasa sérica, lipasa sérica.

Usefulness of amylase and lipase in the diagnosis and treatment of acute abdominal pain

Abstract

The objective of the research was to evaluate how useful is the amylase and serum lipase in the diagnosis and control of treatment of patients with acute abdominal pancreatic and non-pancreatic pain who attended at NORTHOSPITAL Hospital in Quito during the period October to December 2015 and had elevated serum amylase and lipase serum. The variables: age, gender, pathological and family history, reason for consultation, signs and symptoms, laboratory and imaging testing, diagnosis and treatment were obtained from medical records. Tools like: median, frequency, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), ROC curves, t-test for related and ANOVA samples of a factor were employed in the statistical part of this study. It was evidenced, using required statistical tests, that serum lipase has a higher sensitivity (90.91%) compared to amylase (63.3% sensitivity) for pancreatitis diagnosis. Both biochemical parameters offer a 100% specificity. Serum amylase and lipase are elevated in acute pancreatitis and in other non-pancreatic pathologies; therefore other lab and imaging test are needed in order to achieve an effective diagnosis.

Key words: Acute abdominal pain, pancreatitis, serum amylase, serum lipase

1. Introducción

En la actualidad el dolor abdominal agudo es el principal motivo de consulta en el ámbito hospitalario, constituyendo el 50% de las atenciones en servicio de urgencia hospitalaria [1]. Según el Instituto Nacional de Estadística y Censos del Ecuador en el 2014 la pancreatitis de etiología biliar estuvo dentro de las 5 principales causas de morbilidad en el país; por cada 100 egresos, la tasa de letalidad hospitalaria se distribuye en: 1.93 para el dolor abdominal agudo y 2.47 para la pancreatitis aguda; el número total de fallecidos por dolor abdominal agudo fue de 299 personas y para pancreatitis aguda de 194 personas [2].

El término "abdomen agudo" fue introducido a la literatura médica por John B Deaver, quien lo describe como: "cualquier problema intraabdominal agudo que requiere de tratamiento quirúrgico urgente." Mayo M., et al definen al abdomen agudo como una entidad compleja, mórbida, multisindrómica, de defensa aguda ante agresiones abdominales, que precisa un diagnóstico y tratamiento temprano. Puede estar causado por una agresión al compartimento peritoneal, con el dolor abdominal como síntoma predominante y desencadena una fisiopatología intraabdominal y sistémica, evolutivamente grave y rápida, que le da gran potencialidad de producir muerte [3].

En 1921, Sir Zachary Cope señaló la importancia de realizar una anamnesis y examen físico completo. Cope hizo especial hincapié en que no tomar una decisión dentro de las 8 o 10 horas puede implicar un serio peligro para la vida del paciente, y que un retraso de 2 horas equivale entre dos semanas y dos meses para alcanzar la recuperación del paciente [4].

Dentro de las patologías causantes de dolor abdominal agudo que requieren de un tratamiento inmediato encontramos: apendicitis aguda, aneurisma de la aorta abdominal, afectación del árbol biliar (colecistitis, colelitiasis y colangitis aguda), perforación apendicular o de una víscera hueca, obstrucción del intestino delgado o grueso con o sin estrangulamiento, isquemia intestinal, pancreatitis aguda y severa, la rotura de un embarazo ectópico, rotura del bazo, etc. [3-5].

La pancreatitis aguda es una de las causas de dolor abdominal y para su diagnóstico la amilasa y lipasa sérica son los principales biomarcadores utilizados [3]. La amilasa y la lipasa son enzimas digestivas liberadas por los acinos celulares del páncreas exócrino hacia el duodeno. Cualquier daño pancreático libera grandes cantidades de estas enzimas a circulación. La lipasa sérica es la prueba preferida por su mayor sensibilidad,

particularmente en la pancreatitis inducida por el alcohol y por hipertrigliceridemia [6]. Su elevación prolongada crea una ventana de diagnóstico más amplia que la amilasa. En la pancreatitis aguda, la amilasa puede aumentar rápidamente dentro de las 3-6 horas posteriores a la aparición de los síntomas y puede permanecer elevada durante hasta cinco días. La lipasa generalmente alcanza un máximo a las 24 horas, con concentraciones séricas que permanecen elevadas durante 8-14 días. Esto significa que es mucho más útil que la amilasa cuando la presentación clínica o las pruebas se han retrasado por más de 24 horas [7].

Sin embargo numerosas investigaciones demuestran valores aumentados de amilasa y lipasa por encima de tres veces el límite superior de referencia, en casos de insuficiencia renal aguda, fallo renal crónico, enfermedades gastroduodenales e intestinales, patologías neuroquirúrgicas, etc., lo que complica la toma de decisiones médicas al momento de realizar el diagnóstico e instauración del tratamiento [8].

La importancia de este estudio radica en evaluar la utilidad de la amilasa y lipasa sérica en el diagnóstico y control de tratamiento de pacientes con dolor abdominal agudo de origen pancreático y no pancreático, permitiendo al médico tomar una mejor decisión ante la presencia de valores elevados de amilasa y lipasa sérica y no se sospeche de una etiología pancreática.

2. Parte experimental

El estudio es de enfoque mixto, nivel descriptivo correlacional, de tipo retrospectivo. La muestra incluyó a 72 pacientes atendidos en Northospital durante el periodo octubre a diciembre del 2015 que presentaron valores elevados de amilasa y lipasa sérica. Las variables que se estudiaron fueron obtenidas de las historias clínicas del departamento de Archivo y Estadística del Hospital, las cuales son: edad, sexo, antecedentes patológicos y familiares, motivo de consulta, signos y síntomas, pruebas de laboratorio e imagen, diagnóstico y tratamiento. Los analitos fueron procesados en el equipo automatizado Ortho Clinical Vitros 250 Chemistry System de la compañía Johnson & Johnson de acuerdo a las especificaciones para cada analito. Para el análisis bioestadístico se utilizó los programas IBM SPSS Statistics versión 24 y MedCalc® versión 13.3.

3. Resultados y discusión

De los 72 pacientes incluidos en el estudio, el 58,3 % (n= 42) corresponden al género masculino y el 41,7% (n= 30) corresponden al género femenino. La edad me-

dia de los pacientes es de 60.67 años, el rango comprende entre 16 y 96 años, el valor de la mediana es de 64 años, la desviación estándar es de 19.74. En

la tabla 1 se presenta la distribución de frecuencias y porcentajes de las patologías de origen pancreático y no pancreático.

Tabla 1. Patologías con valores elevados de amilasa y lipasa sérica

Patologías	Frecuencia, (n)	Porcentaje, %
Patología Pancreática	18	25
Patología no Pancreática	54	75
Total	72	100,0

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital

3.1 Patologías diferentes a la pancreatitis aguda con aumentos de amilasa y lipasasérica

Se observó patologías diferentes a la pancreatitis aguda que presentan valores elevados de lipasa sérica (Tabla 2) como es el caso de: hemorragia

subaracnoidea (3,0 N), insuficiencia renal crónica (3,3 N), vesícula necrótica perforada (2,9 N), diverticulosis del colon (2,7 N), etc., siendo éstas enfermedades de importancia médica ya que sus elevaciones de tres veces el valor normal (3 N) podrían conducir a un diagnóstico incorrecto en los pacientes asintomáticos.

Tabla 2. Patologías con aumentos de amilasa y lipasa sérica

Patologías	Frecuencia, (n)	Porcentaje, %	Amilasa sérica (U/l) \bar{X}	Lipasa Sérica (U/l) \bar{X}
Coledocolitiasis	22	30,6	144,6 (1,3 N)	488,3 (1,6 N)
Colelitiasis	19	26,4	190,5 (1,7 N)	383,4 (1,3 N)
Colecistitis	12	16,7	159,6 (1,5 N)	273,8 (0,9 N)
Colangitis	8	11,1	115,8 (1,7 N)	458,8 (1,5 N)
Hemorragia subaracnoidea	3	4,2	175,3 (1,6N)	839,3 (3,0 N)
Insuficiencia renal crónica	2	2,8	129 (1,2 N)	1008 (3,3 N)
Vesícula necrótica perforada	1	1,4	174 (1,6 N)	872 (2,9 N)
Ampuloma	1	1,4	418 (3,8 N)	1269 (4,3 N)
Diverticulosis de colon	1	1,4	242 (2,3N)	801 (2,7 N)
Pancreatitis crónica	1	1,4	419 (3,8 N)	1521 (5,1 N)
Tumor maligno páncreas	1	1,4	772 (7,0 N)	8903 (29,6 N)
Pancreatitis aguda grave	1	1,4	4320 (39,3 N)	12680 (42 N)

N representa el valor del límite superior del intervalo normal, para la lipasa sérica corresponde a 300 U/l y para la amilasa sérica corresponde a 110 U/l valores de referencia del equipo automatizado Ortho Clinical Vitros 250 Chemistry System de la compañía Johnson & Johnson. El número que antecede a N representa la relación entre la concentración de amilasa o lipasa sérica alcanzado en cada patología para el valor superior del intervalo normal de cada enzima pancreática.

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital.

3.2 Análisis comparativo entre los indicadores de validez y seguridad diagnóstica de la amilasa y lipasa sérica en el diagnóstico de pancreatitis aguda

Se utilizó como indicadores de validez y seguridad diagnóstica a la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo (Tabla 3) previo a la verificación del grado de correlación

entre la amilasa y lipasa sérica frente a la ecografía abdominal utilizando el coeficiente de kappa de Cohen obteniéndose para la lipasa sérica vs la ecografía abdominal el valor de 0,815 (0,80-1,0) indicando que existe una muy buena concordancia entre ambos resultados, y 0,312 (0,20-0,40) para la amilasa sérica, indicando que existe una escasa concordancia en los resultados del análisis de esta enzima y la ecografía abdominal.

Tabla 3. Evaluación diagnóstica de biomarcadores de pancreatitis aguda

Biomarcadores	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Amilasa sérica	0,64	0,75	0,88	0,43
Lipasa sérica	1,00	0,75	0,92	1,00

VPP valor predictivo positivo, VPN valor predictivo negativo

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital.

3.2 Establecimiento de puntos de corte mediante Curvas Roc

Al realizar el análisis de los biomarcadores de pancreatitis aguda mediante las curvas ROC se observa un área bajo la curva para la amilasa sérica de 0,727 (IC 95%: 0,443 a 0,919) la cual es mayor de 0,50 con un valor $p > 0,05$. El punto de corte para la amilasa sérica es de >350 U/l presentando una sensibilidad del 63,6% (IC 95%: 30,8-89,1), especi-

ficidad 100% (IC 95%: 19,4-99,4), VPP 100%, VPN 50% (Figura 1).

El área bajo la curva para la lipasa sérica es de 0,997 (IC 95%: 0,745 a 0,100) la cual es mayor de 0,50 con un valor $p < 0,05$ lo que nos indica que es estadísticamente significativo. El punto de corte para la lipasa sérica es de >948 U/l presentando una sensibilidad del 90,91% (IC 95%: 58,7-99,8), especificidad 100% (IC 95%: 39,8-100,0), VPP 100%, VPN 80% (Figura 2).

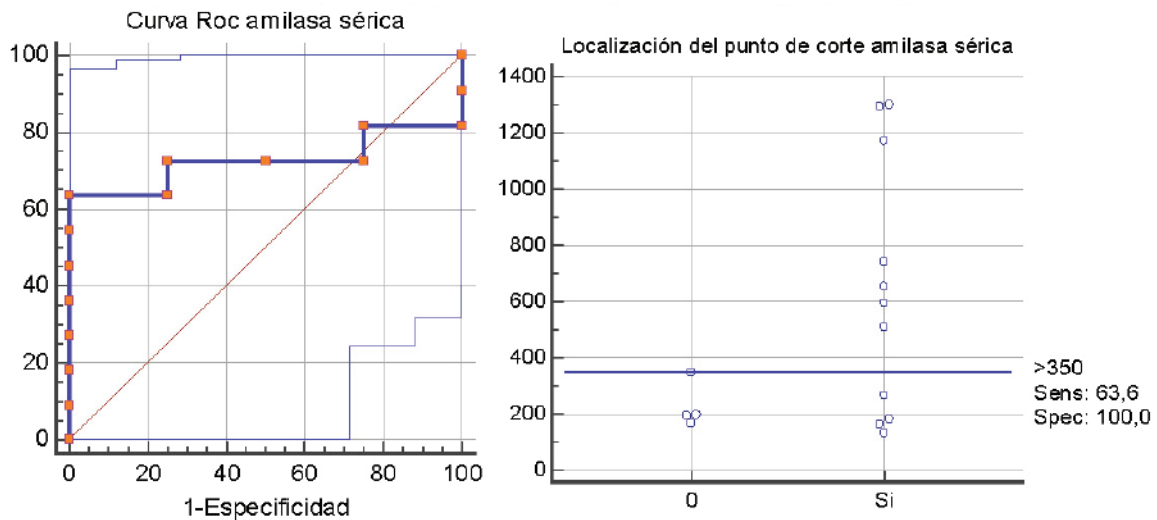


Figura 1. Curvas Roc amilasa sérica y ubicación del punto de corte

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital.

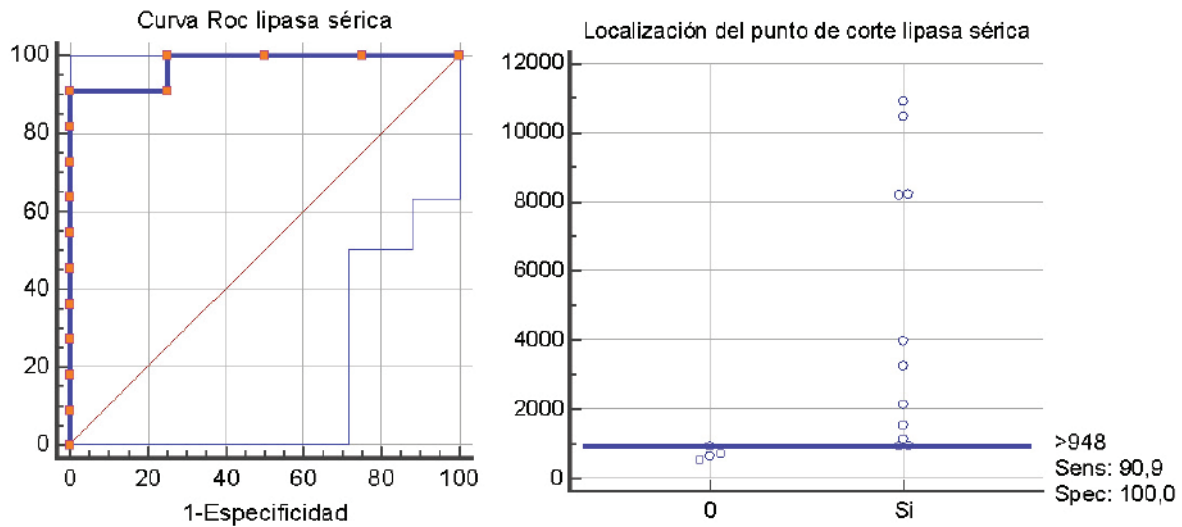


Figura 2. Curva Roc lipasa sérica y ubicación del punto de corte

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital.

3.3 Otros biomarcadores para el diagnóstico de patologías no pancreáticas

Con la finalidad de diferenciar las patologías no pancreáticas con afectación de la vesícula y vías biliares de la pancreatitis aguda se emplea la prueba estadística

Anova de un factor y prueba HSD Tukey para observar la elevación de las enzimas hepáticas, bilirrubina y leucocitos entre la coledocolitiasis, colelitiasis, colecistitis y colangitis. No se incluye el análisis de los valores de la aspartato aminotransferasa TGO/ASAT ya que no presentó elevaciones en estas enfermedades (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de la varianza con un factor

Anova TGP/ALAT	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7865,441	3	2621,814	0,345	0,793
Dentro de grupos	243069,309	57	7595,916		
Total	250934,750	60			

Anova Gamma GT	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	83960,960	3	27986,987	1,465	0,243
Dentro de grupos	611382,679	57	19105,709		
Total	695343,639	60			

Anova Fosfatasa alcalina	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	82140,980	3	27380,327	1,319	0,285
Dentro de grupos	664477,770	57	20764,930		
Total	746618,750	60			

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital.

3.4 Evaluación del tratamiento de la pancreatitis aguda mediante la utilización de la amilasa y lipasa

Para observar la disminución en los valores de amilasa y lipasa sérica post tratamiento se utilizó la prueba t para muestras relacionadas previo la verificación

de su normalidad empleando la herramienta estadística prueba de Kolmogorov-Smirnov, obteniéndose un valor t de 3,894 para la amilasa sérica y 3,561 para la lipasa sérica, indicando que existe una disminución en los valores de sus concentraciones, siendo estas disminuciones estadísticamente significativas $p < 0,05$ (Tabla 4).

Tabla 5. Prueba t para muestras relacionadas

Prueba t	Δ amilasa sérica U/l	Δ lipasa sérica U/l
Media amilasa antes	561,07	3435,13
Media amilasa después	121,73	373,51
Valor t	3,984	3,561
Grados de libertad	14	14
Significancia bilateral	0,001	0,003

* $p < 0.05$ estadísticamente significativo

Fuente: Historias clínicas. Departamento Archivo y Estadística Northospital.

3.5 Discusión

Dentro de las principales causas de elevación de amilasa y lipasa sérica corresponden a una etiología pancreática el 25% (n=18 casos), y a una etiología no pancreática el 75% (n=54).

El conocimiento de las enfermedades no pancreáticas que presentan elevación de amilasa y lipasa sérica tres veces el límite superior del valor normal, permite al médico tomar una mejor decisión ante la presencia de valores elevados de estas enzimas sin compromiso pancreático. Una de estas patologías es la hemorragia subaracnoideo de etiología aneurismática, la cual eleva en 3 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la lipasa sérica observándose el mismo resultado en un estudio retrospectivo de 75 pacientes de una unidad de cuidados intensivos de neurocirugía en donde el 15% de los pacientes presentaron elevación de las enzimas pancreáticas por hemorragia subaracnoidea (29%) y craneotomía (24%). De estos pacientes ninguno presentaba evidencia clínica de pancreatitis aguda, concluyendo los autores que la causa de elevación de las enzimas se debe a una activación a través de vías centrales, tales como incremento del tono vagal, estimulación adrenérgica alterada, y/o la liberación de hormonas de activación tal como la colecistocinina (CCK)[9].

La insuficiencia renal crónica eleva en 3,3 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la lipasa sérica y 1,2 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la amilasa sérica. Resultados similares se observan en un estudio efectuado por Jiang et al., en el año 2002 quienes evaluaron las variaciones en las concentraciones de enzimas pancreáticas en pacientes con enfermedad renal crónica en comparación con controles sanos, encontrando que 28 pacientes (60,7%) presentaban valores elevados de enzimas pancreáticas[10].

En nuestro estudio se tiene un caso clínico de un paciente con vesícula necrótica perforada que produce un aumento de 2,9 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la lipasa sérica y 1,6 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la amilasa. En la bibliografía en el año 2004 Kim et al., reportan un caso clínico de un paciente mujer de 70 años de edad que presentó peritonitis causada por perforación de la vesícula con valores elevados de amilasa y lipasa sérica, pudiendo deberse a la estimulación de la secreción pancreática por acción de las sales biliares[11].

Se encontró además un paciente con divertículos del colon y perforación del colon izquierdo que eleva en 2,7 veces el valor del límite superior del intervalo nor-

mal de la lipasa y 2,3 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la amilasa sérica. Al momento, en la bibliografía no se señalan casos de divertículos de colon o perforación del colon que presente elevación de enzimas pancreáticas. Sin embargo Miranda-Aquino et al., en el 2015 señalan que hasta en un 15% de los pacientes con pancreatitis grave o necrosis pancreática pueden observarse afectaciones en el colon, se cree que la fisiopatología es por extensión de las enzimas pancreáticas y la necrosis como causas principales [12].

En el caso del ampuloma, un tumor de la ampolla de Vater eleva en 4,3 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la lipasa sérica y 3,8 veces el valor del límite superior del intervalo normal de la amilasa sérica. En una publicación de Vicente Lorenzo-Zúñiga et al., realizada en el 2007 señalan que se puede observar cuadros de pancreatitis aguda en pacientes con tumores de la ampolla de Vater secundarios a cuadros de obstrucción ductal a nivel pancreático [13].

Con la finalidad de realizar un mejor diagnóstico de pancreatitis aguda se evaluó a los biomarcadores amilasa y lipasa sérica mediante indicadores de validez, encontrándose que la lipasa sérica posee mayor sensibilidad 100%, valor predictivo positivo 92%, y guarda una buena concordancia con los resultados obtenidos de la ecografía abdominal (medida de acuerdo Kappa 0,815) en comparación con la amilasa sérica. La Sociedad Americana de Patología Clínica entre sus directrices y recomendaciones actuales al 2017, refiere que debe preferirse la determinación de lipasa a la amilasa total y pancreática para el diagnóstico inicial de pancreatitis aguda y que la evaluación no debe repetirse a lo largo del tiempo para controlar el pronóstico de la enfermedad. La repetición de la prueba debe considerarse solo cuando el paciente tiene signos y síntomas de inflamación pancreática o peripancreática persistente, obstrucción del conducto pancreático o desarrollo de un pseudoquistes. En general, se desaconseja la determinación conjunta de amilasa y lipasa, porque aumenta los costos y solo mejora marginalmente la eficacia diagnóstica en comparación con cualquiera de los marcadores solo [8]. Akhtar et al., sustentan entre las ventajas de determinar únicamente lipasa sérica: su mayor sensibilidad, mayor especificidad, rápida elevación y al hecho de permanecer elevada por un periodo de tiempo mayor [14]. Igualmente la guía práctica para pancreatitis aguda de la Asociación Italiana para el estudio del páncreas en la pancreatitis aguda del 2010, recomienda el uso de la lipasa sérica sobre la amilasa sérica para el diagnóstico de pancreatitis aguda [15]. Sin embargo, se debe

tomar en cuenta que a más de la pancreatitis, patologías como colecistitis, isquemia intestinal, insuficiencia renal y tumores malignos provocan la elevación sérica de lipasa [6].

De los marcadores bioquímicos para el diagnóstico de pancreatitis aguda mediante el empleo de Curva Roc la amilasa sérica con una concentración >350 U/l presenta una sensibilidad del 63,6% (IC 95%: 30,8-89,1), especificidad 100% (IC 95%: 19,4-99,4), VPP 100%, VPN 50%. Treacy et al., en el 2001 reporta que la amilasa sérica determinada al segundo día de iniciado el cuadro clínico con una concentración de > 176 U/l presenta una sensibilidad del 45% y una especificidad del 97% [15]. Butler et al., en el 2012 señala que la amilasa sérica con una concentración > 290 U/l presenta una sensibilidad del 65% y una especificidad 90% resultados similares a esta investigación [17]. Otro estudio con resultados semejantes a los de esta investigación es la presentada por Gómez et al., en el 2012, que establecen en un estudio retrospectivo realizado en 151 pacientes con pancreatitis aguda que la sensibilidad de la lipasa es del 96.6% y su especificidad es del 99.4%, en contraste con la sensibilidad de la amilasa del 78.6% y una especificidad del 99.1% [18].

Con respecto a la lipasa sérica empleando Curva Roc, una concentración >948 U/l presenta una sensibilidad del 90,91% (IC 95%: 58,7-99,8), especificidad 100% (IC 95%: 39,8-100,0), VPP 100%, VPN 80%. Treacy et al., en el 2001 reportan que la lipasa sérica determinada al segundo día de iniciado el cuadro clínico con una concentración de > 208 U/l presenta una sensibilidad del 67% y especificidad del 97% [16]. Butler et al., en el 2012 señalan que la lipasa sérica con una concentración > 800 U/l presenta una sensibilidad del 90% y una especificidad del 95% resultados muy similares a esta investigación [17]. Debido a la existencia de un mayor número de patologías que presentan valores elevados de amilasa y lipasa sérica de etiología no pancreática con afección de la vesícula y vías biliares, se realizó un ANOVA con un factor para enzimas hepáticas, bilirrubina total, leucocitos y neutrófilos, encontrándose que en pacientes con coledocolitiasis, colecistitis, colelitiasis y colangitis hay una elevación significativa de la alanina aminotransferasa TGP/ALAT, gamma glutamiltransferasa γ -GT y fosfatasa alcalina. En la publicación de Dolores Velázquez et al., realizada en el 2010 concluyen que el uso de la gamma-glutamiltransferasa permite realizar un diagnóstico de coledocolitiasis [19]., de igual forma López R. X., en el 2012 al evaluar la gamma glutamiltransferasa como factor predictivo temprano en 124 pacientes atendidos en el servicio de cirugía general del Hospital Enrique Garcés de la ciudad de Quito concluye que la

gamma glutamiltransferasa es útil para el diagnóstico de patología obstructiva de la vía biliar [20].

Para evaluar el tratamiento de la pancreatitis aguda mediante el empleo de la amilasa y lipasa sérica se utilizó la prueba t para muestras relacionadas previo a la verificación de su normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p > 0,05$), encontrándose que al registrar los valores de estas enzimas a los tres días de iniciado el cuadro clínico dolor abdominal agudo y los tres días posteriores al tratamiento farmacológico o quirúrgico colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) y/o colecistectomía laparoscópica (Colelap) se observa un descenso significativo $p < 0,05$ indicando eficacia del tratamiento y mejoría del estado del paciente.

En la literatura se señalan casos clínicos de pacientes con aumentos de amilasa y lipasa sérica atribuidos al uso de fármacos, con la finalidad de ver su relación se evaluó los antecedentes farmacológicos de los pacientes, encontrándose el caso de un paciente con fractura de fémur sin posible causa aparente de enfermedad que produzca una elevación de las enzimas pancreáticas, pudiendo atribuirse al uso del fármaco losartan. Badalov et al., concluyen que el diagnóstico de pancreatitis aguda inducida por medicamentos es difícil de establecer, lograron relacionar a 55 fármacos con el desarrollo de pancreatitis, dentro de los cuales se encuentra el losartan, un antagonista del receptor de angiotensina II [21].

4. Conclusiones

- Tanto la determinación de lipasa como la de amilasa sérica, presentan una especificidad del 100% para pancreatitis aguda comparados con la ecografía abdominal.
- Comparando con la ecografía abdominal, la lipasa sérica presentó una sensibilidad del 90.91%, mayor que el 63,6% de sensibilidad para pancreatitis aguda que se determinó para la amilasa sérica.
- Las disminuciones de amilasa y lipasa sérica post tratamiento son estadísticamente significativas, por lo que estas dos enzimas son mar-

cadore bioquímicos que indican eficacia del tratamiento y mejoría del estado del paciente.

- La amilasa y lipasa sérica constituyen biomarcadores de importancia para el diagnóstico y control del tratamiento en pacientes con pancreatitis aguda, sin embargo el 75% de los pacientes incluidos en este estudio presentaban concentraciones elevadas de amilasa y lipasa séricas sin evidencia de una etiología pancreática.
- Las afectaciones a la vesícula biliar y vías biliares son las patologías más comunes que elevan las enzimas pancreáticas.
- Si bien la lipasa sérica es altamente recomendada por las guías médicas como un mejor marcador para el diagnóstico de pancreatitis, las patologías no pancreáticas encontradas que presentan valores elevados de lipasa sérica mayor a tres veces su concentración normal incluyen a la hemorragia subaracnoidea, insuficiencia renal crónica, vesícula necrótica perforada, diverticulosis del colon, ampuloma.
- Elevaciones de amilasa y lipasa séricas no patológicas y no asociadas a dolor abdominal agudo, pueden atribuirse al uso de determinados fármacos, un paciente presentó hiperamilasemia e hiperlipasemia sin otra evidencia etiológica que la administración de losartan.
- En pacientes con coledocolitiasis, colecistitis, colangitis hay una elevación significativa de la alanina aminotransferasa TGP/ALAT, gamma glutamiltransferasa γ -GT y fosfatasa alcalina.
- No se pudo establecer la utilidad diagnóstica y el control de tratamiento de la amilasa y lipasa sérica en patologías de etiología no pancreática debido a la falta de puntos de corte para estas enzimas pancreáticas y prueba Gold estándar para cada patología.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Dr. Juan Pablo Aguayo Director Médico de Northospital por brindar las facilidades para llevar adelante el trabajo de investigación.

Referencias

1. Fernández, J. A. (2009). Validez de las pruebas diagnósticas realizadas a pacientes con dolor abdominal agudo en un servicio de urgencias hospitalario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 610-618. Obtenido de http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1130-01082009000900003&script=sci_arttext&tlng=es
2. INEC. (17 de agosto de 2016). Anuario de Estadísticas Hospitalarias: Egresos y Camas 2014. Obtenido de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>
3. Mayo Ossorio, M., Pacheco García J., Vázquez Gallego J. (2016). Abdomen agudo. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 363-379. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.03.012>
4. Brunicardi, C. (2011). *Principios De Cirugía Schwartz* (Novena ed.). España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
5. Cortes, D. (25 de abril de 2016). Dolor abdominal. Recuperado el 5 de Mayo de 2016, de <http://www.igerontologico.com/salud/digestivo-salud/dolor-abdominal-6398.htm>
6. Basnayake C, Ratnam D. (2015). Blood tests for acute pancreatitis. *Aust Prescr*. 128–130. pmid:26648641
7. American Society for Clinical Pathology (2017). Do not test for amylase in cases of suspected pancreatitis. Instead, test for lipase. *Choosing Wisely*; 2017. www.choosingwisely.org/clinician-lists/american-society-clinical-pathology-testing-for-amylase/. Accessed December 12, 2017.
8. Muniraj, T. (2015). PANCREATITIS OR NOT?--Elevated lipase and amylase in ICU patients. *Journal of Critical Care*, 1370-5. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26411523>
9. Hameed, A. M. (2015). Significant elevations of serum lipase not caused by pancreatitis: a systematic review. *HPB (Oxford)*, 99-112. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24888393>
10. Jiang, C.-F., Ng, K.-W., Tan, S.-W., Wu, C.-S., Chen, H.-C., Liang, C.-T., & Chen, Y.-H. (2002). Serum level of amylase and lipase in various stages of chronic renal insufficiency. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi = Chinese Medical Journal; Free China Ed*, 49-54.
11. Kim, H. J., Park, S. J., Lee, S. B., Lee, J. K., Jung, H. S., Choi, C. K., & Paik, S. Y. (2004). A Case of Spontaneous Gallbladder Perforation. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 128-131. doi:10.3904/kjim.2004.19.2.128
12. Miranda-Aquino, T., Pérez-Topete, S. E., Guajardo-Esparza, J. M., & González-González, J. A. (2015). Necrosis del colon secundaria a pancreatitis aguda. Reporte de un caso y revisión literaria. *Revista de Gastroenterología de México*, 25-29. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2015.09.003>
13. Lorenzo-Zúñiga, V., Moreno De Vega, V., Domènech, E., & Boix, J. (2009). Diagnóstico y tratamiento de los tumores de la papila de Vater. *Gastroenterología y Hepatología*, 81-89. doi:10.1016/j.gastrohep.2008.02.004
14. Akhtar, A., Surode R., Agrawal D. (2017). Measuring both serum amylase and lipase for acute pancreatitis lowers quality and raise cost. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 670-672.
15. Pezzilli, R., Zerbi, A., Di Carlo, V., Bassi, C., Delle Fave, G. F., & Working Group of the Italian Association for the Study of the Pancreas on Acute Pancreatitis. (2010). Practical guidelines for acute pancreatitis. *Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP)*, 523-535. doi:10.1159/000314602
16. Treacy, J., Williams, A., Bais, R., Willson, K., Worthley, C., Reece, J., ... Thomas, D. (2001). Evaluation of amylase and lipase in the diagnosis of acute pancreatitis. *ANZ Journal of Surgery*, 577–582. doi:10.1046/j.1445-2197.2001.02220.x
17. Butler, J., & Mackway-Jones, K. (2012). Serum amylase or lipase to diagnose pancreatitis in patients presenting with abdominal pain. *Emergency Medicine Journal (EMJ)*, 430–431. doi:10.1136/emj.19.5.430
18. Gomez D, Addison A, De Rosa A, Brooks A, Cameron IC. (2012). Retrospective study of patients with acute pancreatitis: is serum amylase still required? *BMJ Open*, 2. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001471>
19. Dolores V., Medina A., Jesús Vega A. (2010). Factores predictivos para el diagnóstico temprano. *Cirujano General*, 39-44.
20. López, R. X. (2012). Utilidad de la gammaglutamil transpeptidasa como factor predictor temprano de coledocolitiasis. *Universidad Central del Ecuador. Postgrado de Cirugía General*, 1-98.
21. Badalov, N., Baradaran, R., Iswara, K., Li, J., Steinberg, W., & Tenner, S. (2007). Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 248-672.

Nanoazitromicina preparada por el método solvente/ antisolvente: efecto sobre la disolución

JONATHAN DIEGO HURTADO JARRIN^{a*}, JAVIER RODRIGO SANTAMARÍA-AGUIRRE^a

^aFacultad de Ciencias Químicas,
Universidad Central del Ecuador (UCE),

*Correspondencia: jonathanhurtado65@gmail.com

Recibido: 28 agosto 2017. Aceptado: 20 noviembre 2017

Resumen

La azitromicina pertenece al grupo II del sistema de clasificación biofarmacéutico, su baja solubilidad acuosa explica su pobre biodisponibilidad. El propósito del presente trabajo fue desarrollar una nanosuspensión de azitromicina por el método solvente/antisolvente para mejorar su velocidad de disolución, para ello se determinó la influencia de la temperatura del medio de dispersión. Una solución etanólica de azitromicina (200 mg/ml) se adicionó a una velocidad de 100 ul/s, sobre una solución acuosa de tween 80 (4,5 mg/ml) a 0, 25 y 80°C. Se obtuvieron nanopartículas de azitromicina de 268,2 nm, con un índice de polidispersión de 0,396, potencial Z de -39,6 mV y 94,2% de pureza. Con ellas se elaboró polvo para reconstituir suspensión oral utilizando hidroxietilcelulosa como coloide protector y goma xantán como viscosante. La velocidad de disolución de las nanopartículas de azitromicina es casi 400% mayor que la azitromicina en polvo.

Palabras clave: nanosuspensión, azitromicina, solvente / antisolvente.

Nano azithromycin prepared by the solvent / antisolvent method: effect on dissolution

Abstract

Azithromycin belongs to group II of the biopharmaceutical classification system, its low aqueous solubility explains its poor bioavailability. The purpose of the present work was to develop a Nano suspension of azithromycin by the solvent / antisolvent method to improve its dissolution speed, for this, the influence of the temperature of the dispersion means was determined. An ethanolic solution of azithromycin (200 mg / ml) was added at a rate of 100 ul / s, on an aqueous solution of tween 80 (4.5 mg / ml) at 0, 25 and 80°C. Azithromycin nanoparticles of 268.2 nm were obtained, with a polydispersity index of 0.396, Z potential of -39.6 mV and 94.2% purity. With them, powder was made to reconstitute oral suspension using hydroxyethyl cellulose as a protective colloid and xanthan gum as a viscosifier. The dissolution speed of azithromycin nanoparticles is almost 400% higher than azithromycin powder.

Key words: nanosuspension, azithromycin, solvent / antisolvent.

1. Introducción

Es sumamente raro encontrar fármacos que se administren como sustancias puras, por lo contrario, en su mayoría se administran en forma de preparados farmacéuticos o medicamentos, que puede variar desde soluciones relativamente sencillas a sistemas complejos conseguidos mediante el uso de aditivos y excipientes adecuados; existen un sin número de formas farmacéuticas en las cuales se puede incorporar un fármaco para tratar de manera eficiente y cómoda una enfermedad, los fármacos son diseñados para ser administrados por diferentes vías, con la finalidad de conseguir una respuesta terapéutica máxima [1].

La vía oral es la más utilizada, cerca del 40 % de los medicamentos la emplean [2]; en comparación con otras vías es sencilla, más cómoda y de mayor seguridad, sin embargo, una de las limitantes más importantes al momento de diseñar formas farmacéuticas orales, se da cuando el proceso de disolución es un paso limitante para la absorción del fármaco en el organismo; efecto que se ve agravado cuando en fármacos poco solubles o insolubles, llegando incluso a no obtenerse el efecto terapéutico deseado debido a su baja biodisponibilidad; los fármacos más susceptibles son aquellos que pertenecen al grupo II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS): alta permeabilidad, baja solubilidad y los del grupo IV: baja permeabilidad, baja solubilidad [3].

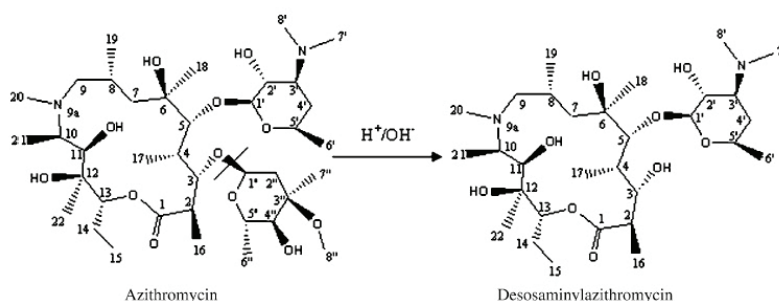


Figura 1. Estructura química y degradación de la azitromicina [5].

En la figura 1 se muestra la estructura de la azitromicina que consiste en un anillo de lactona macrocíclica de 15 miembros, al que se encuentran unidos dos azúcares, un aminoazúcar, d-desosamina mediante un enlace β-glucosídico a la posición C5 del anillo de lactona y un azúcar neutro, l-cladinoso a través de un enlace α-glucosídico a la posición C3 de la lactona [5].

Tras la administración por vía oral a voluntarios sanos, la biodisponibilidad es aproximadamente del 37% y la unión a proteínas oscila alrededor del 50% [6].

La Azitromicina se degrada en medio acuoso, en la figura 1 también se observa el principal producto de degradación, desosaminilazitromicina que se forma por la división del enlace α-glucosídico entre el azúcar l-cladinoso y la lactona [5].

Una solución tradicional para este problema ha sido formular comprimidos o suspensiones, estas últimas son dispersiones gruesas en las que partículas insolubles del principio activo, generalmente mayores a 1 μm, se encuentran distribuidas en un medio líquido;

las suspensiones no están exentas de limitantes: pobre o casi nula solubilidad, baja velocidad de disolución, inestabilidad física, reducida área superficial y gran tamaño de partícula; teniendo en cuenta que alrededor del 40 % de los nuevos fármacos generados en los programas de investigación son lipófilos o poco solubles en agua [7], su incorporación en este tipo de sistema de entrega supone un reto importante para la industria farmacéutica.

En las últimas décadas la ingeniería de nanopartículas ha tomado alta relevancia en aplicaciones farmacéuticas [8], intentando resolver los problemas asociados con las limitantes descritas anteriormente; la nanotecnología permite obtener partículas de 10⁻⁹ m mediante el proceso de abajo-arriba o de arriba-abajo; al reducir el tamaño de las partículas se incrementa la superficie específica y por ende su velocidad de disolución, absorción en el organismo, la uniformidad del contenido y estabilidad física en sistemas heterogéneos.

El proceso de abajo-arriba implica una técnica de precipitación solvente/antisolvente, en la que el fár-

maco se disuelve primero en un disolvente orgánico y después se precipita en presencia de un estabilizante. El uso de equipos simples y de bajo costo es la principal ventaja de la técnica de precipitación. En este proceso, se requiere la adición de tensoactivo para evitar la coagulación de nanopartículas en micropartículas. El fármaco necesita ser soluble en al menos un disolvente, que debe ser miscible con otro no disolvente. Sin embargo, esta técnica no es aplicable a fármacos que son poco solubles tanto en medios acuosos como no acuosos [9].

Por esta razón el uso de esta nueva tecnología en la producción nacional de medicamentos propone un enfoque viable para formular fármacos poco solubles, con un aumento de la biodisponibilidad que podría conducir a una disminución de la dosis, así como de los costos, incrementando la accesibilidad de los medicamentos a las poblaciones de escasos recursos.

2. Parte experimental

En una primera etapa se investigó cómo influye la temperatura del medio de dispersión en la obtención de nanopartículas de azitromicina por el método solvente/antisolvente; para lo cual se ensayó la temperatura del medio de dispersión a 0,25 y 80 °C.

Para determinar la influencia del tamaño de partícula de azitromicina sobre la velocidad de disolución, se elaboraron polvos para reconstituir suspensiones orales variando el tamaño de partícula entre azitromicina y nanoazitromicina, se caracterizó el volumen de sedimentación, contenido, potencial Z y se determinó su perfil de disolución.

Tabla 1. Resumen de la caracterización de las nanopartículas de azitromicina obtenidas a tres diferentes temperaturas.

Temperatura, °C	Tamaño de partícula, nm	Índice de polidispersión	Potencial Z, mV
0	100,2	0,484	-31,8
25	157,1	0,523	-45,1
80	1953,3	3,324	-15,5

Se obtuvieron nanopartículas cuando el medio de dispersión se encontraba a 0 y 25°C; sus índices de polidispersión fueron semejantes y los potenciales Z inferiores a -30 mV. Se seleccionó el tratamiento a

Procedimiento:

Elaboración de nanopartículas por el método solvente/antisolvente

Se preparó una solución madre de azitromicina (200 mg/ml) en etanol al 96 %, y se filtró a través de una membrana de PVDF de 0,45 µm; esta solución se adicionó con una jeringuilla de 3 ml con aguja # 21, a una velocidad de 100 µl/s sobre una solución de Tween 80 (4,5 mg/ml) agitada a 3200 rpm; se mantuvo la agitación durante 5 minutos y el secado se realizó a 30 °C durante 48 horas en lecho estático.

Elaboración de la nanosuspensión

Se preparó el polvo para reconstituir suspensiones orales utilizando: azitromicina dihidrato, sacarosa, sodio fosfato tribásico anhidro, hidroxietilcelulosa (NATRO-SOL 250HX Pharm), goma xantán y los aromas cereza, vainilla y plátano (MAGIC FLAVORS); tanto los excipientes como el activo fueron tamizados en malla 0,85 mm y mezclados.

3. Resultados y discusión

Efecto de la temperatura del medio de dispersión

Las nanopartículas secas fueron resuspendidas con una concentración de 24,5 mg/ml en agua tipo 1 y llevadas al ultrasonido por 5 minutos.

En la tabla 1 se resumen las variables respuesta para cada condición de temperatura, cada valor representa el promedio de las 3 réplicas de cada tratamiento.

25°C pues al trabajar a temperatura ambiente no se necesita energía para poder disminuir la temperatura del medio de dispersión lo cual conlleva al ahorro de recursos.

Elaboración y caracterización de las nanopartículas de azitromicina obtenidas con el mejor tratamiento

Una vez definido el tratamiento para elaborar las nanopartículas, se preparó un lote tomando en cuenta la

cantidad necesaria para poder realizar todos los estudios. Los resultados de la caracterización representan el promedio de 3 mediciones la cual se describe en la Tabla 2 y la Figura 2.

Tabla 2. Caracterización de las nanopartículas de azitromicina obtenidas

Tamaño de partícula, nm	Índice de polidispersión	Potencial Z, mV	Pureza, %
268,2	0,396	-39,6	94,2 %

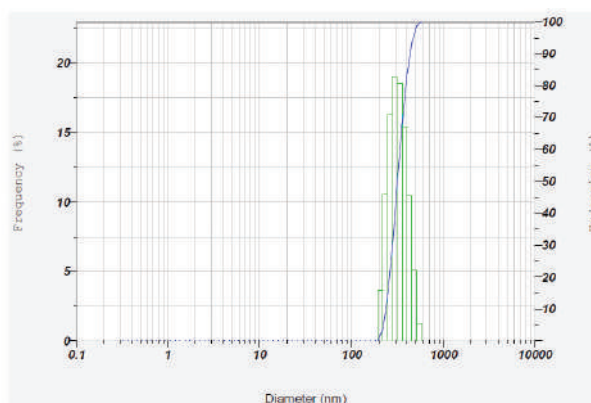


Figura 2. Tamaño de partícula de las nanopartículas determinado en DLS

Perfiles de disolución entre suspensiones de azitromicina vs nanopartículas de azitromicina

La tabla 3 detalla los resultados obtenidos en los perfiles de disolución, mismos que se grafican en la Figura 4.

Tabla 3. Porcentaje de disolución de las suspensiones preparadas con azitromicina y nanoazitromicina.

Tiempo minutos	% Disuelto	
	Azitromicina (AZT SUSP)	Nanopartículas (NAZT SUSP)
5	21,4	81,4
10	32,6	93,3
15	42,9	95,5
25	54,7	97,8
35	65,0	97,5

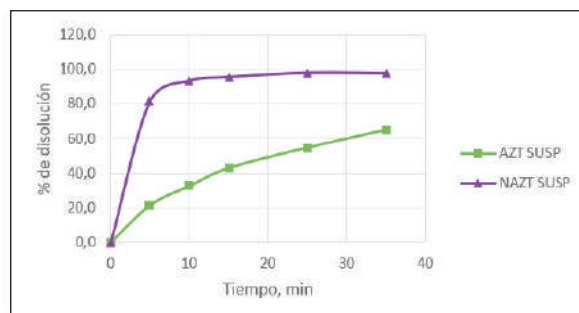


Figura 3. Perfiles de disolución de las suspensiones preparadas con azitromicina (AZT SUSP) y nanoazitromicina (NAZT SUSP).

Existe una gran diferencia entre los dos perfiles de disolución: la suspensión de nanoazitromicina liberó a los 5 minutos el 81,4 % mientras que la suspensión de azitromicina solo el 21,4 %; esta diferencia se debe no solo a la reducción del tamaño de partícula, sino también, al hecho de que las par-

tículas de nanoazitromicina incluyen al tween 80 en su composición, favoreciéndose la humectación y la disolución. Según la USP 39 para los productos que se disuelven muy rápidamente ($\geq 85\%$ de disolución en 15 minutos) no es necesario el perfil de comparación.

Comparación entre los parámetros caracterizados en la suspensión de azitromicina y nanoazitromicina

Tabla 4. Parámetros caracterizados en la suspensión de azitromicina y nanopartículas de azitromicina.

Suspensión	Contenido, %	Potencia Z, mV	Volumen de sedimentación
Azitromicina	103,8	-35,0	0,94
Nanopartículas	104,6	-39,6	1,00

Al analizar los datos detallados en la tabla 4, podemos observar que las suspensiones de azitromicina y nanoazitromicina cumplen con las especificaciones planteadas, en contenido no mayor que 110 % ni menor que 90 %, en potencial Z valores superiores a + 30 mV o inferiores a -30 mV y volumen de sedimentación $\geq 0,8$.

4. Conclusiones

Se elaboraron nanopartículas de azitromicina usando como medio de dispersión una solución acuosa de tween 80 (4,5 mg/ml), a 0, 25 y 80 °C y se determinó que la variable temperatura influye de una forma directamente proporcional sobre el tamaño de partícula

de azitromicina; es decir a menor temperatura del medio de dispersión se pueden obtener partículas que se encuentran en escala nanométrica.

Las nanopartículas de azitromicina, obtenidas por el método solvente/antisolvente usando medio de dispersión a 25 °C, presentaron un tamaño de 268,2 nm, índice de polidispersión 0,396, potencial Z de - 39,6 mV y 94,2 % de pureza.

Se desarrolló un polvo para reconstituir suspensiones orales usando nanopartículas de azitromicina, con una velocidad de disolución 3,8 veces mayor que la suspensión de azitromicina original.

Referencias

- [1] Aulton, M. E. (2004). *La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. Madrid: Elsevier.
- [2] Lim Chin, W. W., & Parmentier, J. (2014). A Brief Literature and Patent Review of Nanosuspensions to a Final Drug Product. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2980-2999.
- [3] Brito, Y. (2015). *Clasificación Biofarmacéutica Provisional de los Ingredientes Farmacéuticos Activos de los Sólidos Orales de Liberación Inmediata del Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba*. Santa Clara: Ediciones Alarcos.
- [4] Aceituno, A. (23 de 01 de 2013). Decretos 864 y 981: productos afectos, plazos y requerimientos. Obtenido de Departamento Agencia Nacional de Medicamentos Chile: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/Decretos%20864%20y%20981%20\(AAA\).pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/Decretos%20864%20y%20981%20(AAA).pdf)
- [5] Zhang, Y. (2009). Aspects of Degradation Kinetics of Azithromycin in Aqueous Solution. *Chromatographi*, 67-63.
- [6] AEMPS. (01 de 2011). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Obtenido de Gobierno de España: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/61272/FT_61272.pdf
- [7] Patel VR, A. Y. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 81-87.
- [8] Sheth P, S. H. (2012). Nanoparticles in the pharmaceutical industry and the use of supercritical fluid technologies for nanoparticle production. *PublMed*, 269-284.
- [9] Shah, D., & Murdande, S. (2015). A Review: Pharmaceutical and Pharmacokinetic Aspect of Nanocrystalline Suspensions. *ELSEVIER*, 10-24.

Influencia del extracto de Chamana (*Dodonaea viscosa*) en la estabilidad de jarabe de Vitamina C

MIREYA MEDINA^{a*}, DAYANA BORJA^a
Facultad de Ciencias Químicas,
a Universidad Central del Ecuador (UCE), Quito, Ecuador

*Correspondencia: mir_medina02@hotmail.com

Recibido: 30 de septiembre 2017, Aceptado: 24 de noviembre de 2017

Resumen

Dodonaea viscosa (Chamana) tiene potencial biológico, gracias a metabolitos secundarios presentes, principalmente en su raíz y hojas. Entre sus atributos resalta su actividad antioxidante, motivo por el cual, en este trabajo se evaluó cómo influye la capacidad antioxidante que presenta el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Dodonaea viscosa* en la estabilidad del jarabe de vitamina C. Se realizaron tres lotes piloto de jarabe de ácido ascórbico: 1) libre de antioxidante, 2) con antioxidante natural (extracto) y 3) con antioxidante sintético (metabisulfito de sodio), estos fueron sometidos a un estudio de estabilidad acelerado, bajo los siguientes parámetros: 3 meses, T: $40 \pm 2^\circ\text{C}$; HR: $75 \pm 5\%$. Como resultado se obtuvo que la concentración del principio activo en el producto con metabisulfito de sodio se mantiene por mayor tiempo, mientras que el jarabe con antioxidante natural fue el que presentó mayor actividad antioxidante.

Palabras clave: *Dodonaea viscosa*, capacidad antioxidante, vitamina c, estabilidad.

Influence of Chamana's extract (*Dodonaea viscosa*) in vitamin C syrup stability

Abstract

Dodonaea viscosa (Chamana) has biological potential due to secondary metabolites presented mainly in their root and leaves. The main purpose of this research was to evaluate how the antioxidant capacity presented in the hydroalcoholic extract *Dodonaea viscosa* leaves, influences the stability of the vitamin C syrup. Three pilot batches of ascorbic acid syrup were carried out: 1) free of antioxidant, 2) with natural antioxidant (hydroalcoholic extract) and 3) with synthetic antioxidant (sodium metabisulfite). These samples were subjected to an accelerated stability study, under the following parameters: 3 months, T: $40 \pm 2^\circ\text{C}$; RH: $75 \pm 5\%$. As a result, the product with the highest API concentration over time was the one containing sodium metabisulfite. On the other hand, the one with the highest antioxidant capacity was the syrup with natural antioxidant.

Keywords: *dodonaea viscosa*, antioxidant capacity, vitamin C, stability.

1. Introducción

En la actualidad, la población consume un sin número de vitaminas para mantener su salud, entre ellas, el ácido ascórbico. Esta vitamina hidrosoluble presenta propiedades benéficas, una de las más relevantes es su capacidad antioxidante. Diferentes factores tales como: presencia de oxígeno, metales, cambios de pH, concentraciones de sales y azúcares, enzimas, aminoácidos, oxidantes y reductores, luz, dosificación multidosis, entre otros afectan directamente a la estabilidad del jarabe de vitamina C [1], siendo éste una de las formas farmacéuticas líquidas más sensibles a los agentes mencionados.

La degradación del ácido ascórbico (AA) se produce mediante procesos oxidativos que resultan de la transferencia de dos electrones. Primero se origina el monoanión ascorbato (AH), el mismo que con la pérdida adicional de un segundo electrón, forma el ácido L-de-hidroascórbico (ADA), éste es altamente inestable y susceptible a la hidrólisis del anillo lactónico, que se hidroliza con gran facilidad para producir ácido 2,3-dicetogulónico (DCG), que posteriormente se degrada por descarboxilación, con la consiguiente pérdida del valor funcional y nutricional del ácido ascórbico (AA) [2].

Según Manjilstha Dhananjay Pujar, *Dodonaea viscosa* es una planta con un elevado potencial biológico gracias a la cantidad de compuestos fenólicos y polifenólicos que contiene, siendo estos responsables de su actividad antioxidante [3].

Las diferentes formas farmacéuticas sometidas a distintas condiciones de almacenamiento, presentan una mayor estabilidad y por ende un mayor contenido de su principio activo cuando un antioxidante forma parte de su formulación [4].

Un antioxidante neutraliza las especies reactivas. Además si éstos se encuentran juntos en un mismo sistema pueden presentar algunas interacciones produciendo así diversos efectos: sinergismo, adición y antagonismo según Criado Dabrowska & Moya Mir [5].

Existen diversas propuestas para evitar que el ácido ascórbico, el cual también posee capacidad antioxidante se degrade rápidamente en las diferentes formas farmacéuticas, considerando que las líquidas son las más vulnerables. Aprovechar la gran biodi-

versidad natural que tiene Ecuador representa una opción, ya que varias especies vegetales gozan de actividad antioxidante.

La adición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Dodonaea viscosa*, al jarabe de vitamina C, se lo realizó con varios objetivos: evitar la sobredosificación del principio activo en la forma farmacéutica líquida representando un ahorro económico a nivel industrial, potenciar por un efecto de adición o sinergismo la capacidad antioxidante final de la forma farmacéutica líquida, mantener las cantidades iniciales del principio activo por un mayor periodo de tiempo asegurando así el efecto farmacoterapéutico, lo cual influye de manera positiva en la salud y economía de la población que lo adquiera.

2. Parte Experimental

La investigación ejecutada se realizó en etapas:

Etapa I: Obtención del extracto hidroalcohólico de *Dodonaea viscosa*.

Se mezcló 100g de hojas secas y molidas con 400ml de etanol 70°, se dejó macerar por 48h con agitación constante, posteriormente se filtró al vacío, se reservó el filtrado (filtrado 1) y se percoló el residuo con 450ml de etanol 70° por 48h, 5 gotas/min, se filtró al vacío (filtrado 2). Se une el filtrado 1 + filtrado 2 y se concentra en Rotavapor a 30°C hasta consistencia sirope.

Etapa II: Se formuló y elaboró tres lotes piloto de 16 muestras de jarabe de vitamina C de 30ml a una concentración de 100mg/5ml. El primer lote libre de antioxidante, segundo lote con antioxidante natural (extracto hidroalcohólico de las hojas de *Dodonaea viscosa*) y tercer lote con antioxidante sintético (metabisulfito de sodio).

Etapa III: Se cuantificó el contenido de ácido ascórbico presente en el jarabe, a los tiempos (1, 15, 30, 60 y 90 días) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y con detector UV.

Tabla 1. Parámetros de cuantificación de Vitamina C, por HPLC en fase reversa

Parámetro	Condición de operación
Estándar	Ácido ascórbico
Tipo de columna	C 18
Tamaño de partícula	3 μ m
Longitud	150 mm
Diámetro interno	4,6mm
Temperatura de columna	24.0 \pm 2.0°C
Fase móvil	Ácido fosfórico al 0,01% / metanol / acetonitrilo (90:8:2)
pH fase móvil	2,84 \pm 0,03
Velocidad de flujo	1.0ml/min
Volumen de inyección	20,0ul
Temperatura de muestras	24.0 \pm 2.0°C
Detector	UV (254nm)
Tiempo de retención	2,15 \pm 0,30 min

Etapa IV: Se Determinó la capacidad antioxidante del producto terminado empleando el método de Blois (radical DPPH) acorde al procedimiento reportado por Recalde Armas, 2014 [6] a los tiempos (1, 15, 30, 60 y 90 días).

Etapa V: Control de calidad de jarabe de vitamina C, acorde lineamientos para formas farmacéuticas líquidas (inspección visual, densidad, pH) [7] [8]. El ensayo microbiológico se realizó a los tiempos 1 y 90 días [9].

3. Resultados y Discusión

Tanto para la cuantificación de ácido ascórbico como para determinación de la capacidad antio-

xidante se empleó un diseño factorial modelo AXB (tabla 2), con su respectivo análisis de varianza (Anova multifactorial).

Variables Independientes

- Tipo de antioxidante y tiempo.

Variables Dependientes

- Concentración de ácido ascórbico, en el producto final.
- Porcentaje de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH), en el producto final.

Tabla 2. Características de diseño

Factor A	Tipo de antioxidante
Factor B	Tiempo
Número de tratamientos (AXB)	3X5= 15
Número de muestras por punto temporal (n)	3
Número de corridas n(AXB)	3(3X5)= 45
Variables respuesta	- Concentración de Vitamina C (mg/5ml) - Porcentaje de inhibición de radicales libres (DPPH)

Tabla 3. Características de los factores de estudio

Factores de estudio			
Tiempo (días)	Representación	Tipo de antioxidante	Representación
1	T1	Libre	L
15	T2	Natural	N
30	T3	Sintético	S
60	T4		
90	T5		

Tabla 4. Combinaciones entre factores

Tipo de antioxidante		Concentración de Vitamina C (mg/5ml) Porcentaje de inhibición de radicales libres			
		T1	T2	T3	T4
L		L1T1	L1T2	L1T3	L1T4
		L2T1	L2T2	L2T3	L2T4
		L3T1	L3T2	L3T3	L3T4
		N1T1	N1T2	N1T3	N1T4
N	Repeticiones	N2T1	N2T2	N2T3	N2T4
		N3T1	N3T2	N3T3	N3T4
		S1T1	S1T2	S1T3	S1T4
S		S2T1	S2T2	S2T3	S2T4
		S3T1	S3T2	S3T3	S3T4

Para elaborar las hipótesis para el análisis de varianza del diseño factorial AXB se consideraron los tratamientos presentados en (Tabla 4).

Hipótesis para la cuantificación del ácido ascórbico son las siguientes:

*Para el Factor A (Tipo de antioxidante)

$$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots = \alpha_a = 0$$

$$H_1: \alpha_i \neq 0 \text{ para algún } i$$

H_0 El tipo de antioxidante no ejerce efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes de vitamina C.

H_1 El tipo de antioxidante ejerce efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes de vitamina C.

*Para el Factor B (Tiempo)

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_b = 0$$

$$H_1: \beta_j \neq 0 \text{ para algún } j$$

H_0 El tiempo no ejerce efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes de vitamina C.

H_1 El tiempo ejerce efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes de vitamina C.

*Para la interacción AB (Tipo de antioxidante – tiempo)

$$H_0: (\alpha\beta)_{ij} = 0 \text{ para todo } ij$$

$$H_1: (\alpha\beta)_{ij} \neq 0 \text{ para algún } ij$$

H_0 La interacción tipo de antioxidante – tiempo ejerce efecto sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes.

H_1 La interacción tipo de antioxidante – tiempo no ejerce efecto sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes.

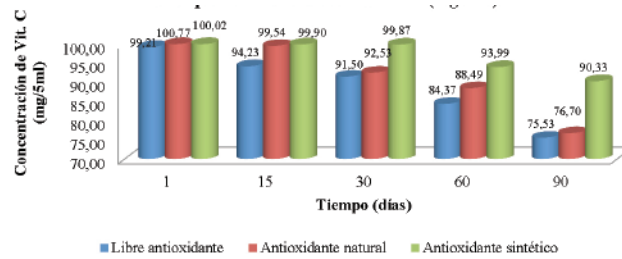


Gráfico 1. Relación tipo de antioxidante, tiempo y concentración de Vitamina C.

Se cuantificó el contenido de principio activo en los diferentes jarabes mediante HPLC, obteniendo los resultados que se muestran en la gráfica 1, se observa que a medida que avanza el tiempo (1 – 90 días) la concentración de vitamina C disminuye. En el jarabe libre de antioxidante la reducción de activo es notoria hasta llegar a 24,47% menos de su concentración inicial. La adición de antioxidante natural ayuda a mantener la concentración de vitamina C los primeros 30 días, pero en el día 90 ya muestra un decremento de 23,3% similar al producto que no contiene antioxidante. El jarabe que contiene antioxidante sintético es aquel que presenta el mejor resultado ya que el último día de cuantificación presenta únicamente un 9,67% menos de su cantidad original.

Análisis estadístico - Concentración de Vitamina C

Tabla 5. Análisis de Varianza para Concentración de Vitamina C.

Fuente	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES		
A: Tipo de antioxidante	47,59	0,0000
B: Tiempo	103,40	0,0000
INTERACCIONES		
AB	6,24	0,0001

En la tabla 5, se observa que los factores principales: tipo de antioxidante y tiempo, además de la interacción entre ellos, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Concentración de Vitamina C con un 95,0% de nivel de confianza, debido a que los valores de P son menores a 0,05. Esto conlleva a comprobar las siguientes hipótesis de trabajo:

H_1 El tipo de antioxidante ejerce efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes de vitamina C.

H_1 El tiempo ejerce efecto significativo sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes de vitamina C.

H_1 La interacción tipo de antioxidante – tiempo ejerce efecto sobre el contenido de ácido ascórbico de los jarabes.

Tabla 6. Pruebas de Rangos Múltiples para Concentración de Vitamina C por Tipo de antioxidante.

Tipo de antioxidante	Media LS	Grupos Homogéneos
Libre antioxidante	88,8717	X
Ant. natural	91,6071	X
Ant. sintético	96,8226	X

La tabla 6, indica los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento de comparación múltiple (Tukey) para determinar qué medias con respecto al tipo de antioxidante son significativamente diferentes de otras. La alineación de las X's no es homogénea, esto indica que existe diferencias estadísticamente significativas entre las tres medias en cuestión con un nivel del 95% de confianza. Siendo el jarabe con antioxidante sintético el que muestra la mayor media, por ende el que mejor actúa para mantener la concentración del ácido ascórbico.

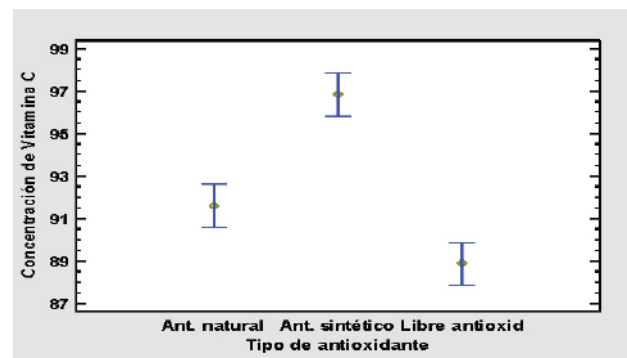


Gráfico 2. Gráfica de medias – pruebas de múltiple rangos para concentración de vitamina C por tipo de antioxidante.

De acuerdo a al gráfico 2, el jarabe de vitamina C que contiene antioxidante sintético, presenta una media más elevada, esto significa que este antioxidante da una mejor protección al principio activo.

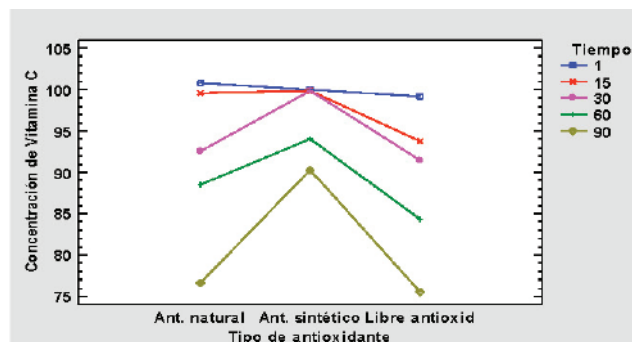


Gráfico 3. Efecto de las interacciones de dos factores (tipo de antioxidante y tiempo) sobre la concentración de vitamina C (mg/5ml).

En la gráfica 3, se muestra que en el día uno las concentraciones de vitamina C son equivalentes, en el día 15 el jarabe libre de antioxidante disminuye notoriamente la cantidad de activo mientras que en los productos que contienen antioxidantes el principio activo se mantiene. En el día 30 el único jarabe que mantiene la concentración inicial de ácido ascórbico es aquel que contiene el antioxidante sintético, los otros dos casos continúa mostrando un

decremento. A partir del día 60 en los productos con los tres tipos de antioxidantes se observa una reducción del ácido ascórbico.

Finalmente el jarabe con metabisulfito de sodio que estuvo sometido a T: $40 \pm 2^\circ\text{C}$; HR: $75 \pm 5\%$ durante 90 días fue el que tuvo mayor cantidad de vitamina C, demostrando así que el metabisulfito pierde fácilmente sus electrones para neutralizar las especies reactivas, de ésta forma impide que el ácido ascórbico pierda sus electrones y por ende no se degrade.

Para la determinación del porcentaje de inhibición de radicales libres (DPPH), se consideraron las mismas hipótesis que se emplearon para la cuantificación del ácido ascórbico, cambiando la variable respuesta.

La gráfica 4 indica, el porcentaje de inhibición de radical DPPH del jarabe de Vitamina C: libre de antioxidante, con antioxidante natural y con antioxidante sintético a (1, 15, 30, 60 y 90 días).

Se observa que sí influye la incorporación de antioxidantes en la formulación del jarabe de vitamina C. El producto terminado que contiene antioxidantes ya sea el extracto hidroalcohólico de *Dodonaea viscosa* o el metabisulfito de sodio, mantiene su actividad antioxidante a los 90 días, mientras que el jarabe simple no.

De lo anterior mencionado, se concluye que si existe interacción de adición entre los antioxidantes presentes en cada una de las formulaciones.

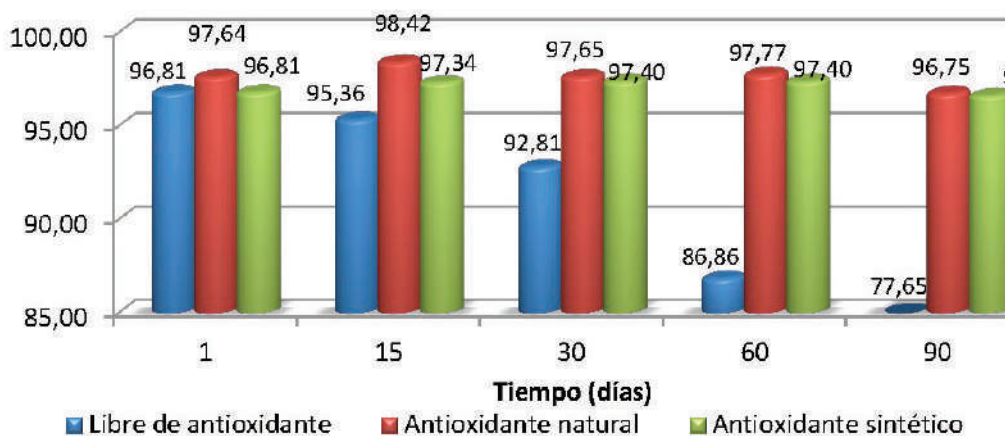


Gráfico 4. Porcentaje de Inhibición de radical DPPH en función del tiempo y tipo de antioxidante

Tabla 7. Análisis de Varianza para Inhibición de radicales libres

Fuente	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES		
A: Tipo de antioxidante	1655,21	0,0000
B: Tiempo	424,96	0,0000
INTERACCIONES		
AB	334,43	0,0000

Análisis estadístico - % de inhibición

En la tabla 7, se aprecia que los factores principales: tipo de antioxidante y tiempo, además de la interac-

ción entre ellos, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de inhibición de radicales libres con un 95,0% de nivel de confianza, debido a que los valores de P son menores a 0,05. Esto conlleva a comprobar las siguientes hipótesis de trabajo:

H_1 El tipo de antioxidante ejerce efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

H_1 Existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) entre los jarabes de vitamina C debido a los diferentes periodos de tiempo.

H_1 La interacción tipo de antioxidante – tiempo ejerce efecto sobre el porcentaje de inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Tabla 8. Pruebas de Rangos Múltiples para Inhibición de radicales libres por Tipo de antioxidante.

Tipo de antioxidante	Media LS	Grupos Homogéneos
Libre antioxidante	89,9013	X
Ant. sintético	97,114	X
Ant. natural	97,6453	X

La tabla 8, muestra los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento de comparación múltiple (Tukey) para determinar qué medias de porcentaje de inhibición de radicales libres (DPPH) son significativamente diferentes entre sí. La alineación de las X's no es homogénea, esto indica que existe diferencias estadísticamente significativas entre las tres medias en cuestión con un nivel del 95% de confianza. Siendo el jarabe con antioxidante natural el que muestra la mayor media por ende el producto con mejor capacidad antioxidante, caso contrario ocurre con el producto libre de antioxidante que exhibe la media más baja.

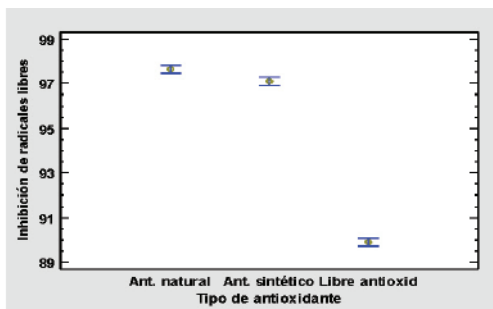


Gráfico 5. Gráfica de medias – pruebas de múltiple rangos para inhibición de radicales libres por Tipo de antioxidante.

De acuerdo a la gráfica 5, se observa que el jarabe de vitamina C libre de antioxidante posee la media más baja, seguido del jarabe con antioxidante sintético y finalmente por aquel que contiene antioxidante natural, esto significa que el antioxidante natural es aquel que proporciona mayor capacidad antioxidante.

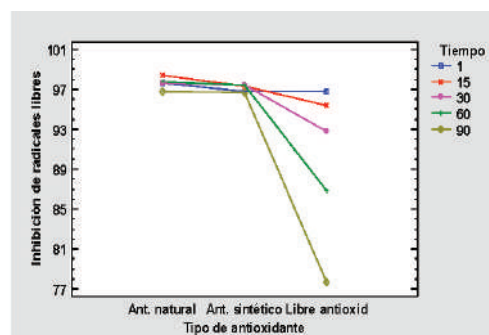


Gráfico 6. Efecto de las interacciones de dos factores (tipo de antioxidante y tiempo) sobre el porcentaje de inhibición de radicales libres (DPPH).

En la gráfica 6, se muestra que el porcentaje de inhibición del radical DPPH en el jarabe libre de antioxidante va en decremento a medida que transcu-

En los días, mientras que los productos que contienen el antioxidante natural y el sintético la variable respuesta se mantiene a lo largo del tiempo (del día 1 al 90).

Se efectuó el control de calidad de los jarabes de vitamina C, considerando parámetros organolépticos, físicos y microbiológicos.

En tabla 9, se aprecia que las características organolépticas se mantienen a medida que transcurre el tiempo, excepto que el color del producto al día 90 presenta un amarillo levemente intenso. Los parámetros físicos como pH y densidad no cambian, se mantienen.

En tabla 10, se aprecia que en lo referente a las características organolépticas el olor y el sabor cambian a partir del día 15, cabe señalar que el sabor ni el olor son desagradables al gusto. El color al día 90 se hace un poco más intenso comparado con el inicial. Con respecto al pH y densidad los valores se conservan.

En la tabla 11, se muestra que el olor cambia ligeramente a partir del día 30, al día 90 el color se hace más intenso y el sabor se mantiene al final. Su aspecto se conserva homogéneo al igual que su pH y densidad.

Según la tabla 12, los productos elaborados cumplen con las especificaciones microbiológicas para formas farmacéuticas acuosas no estériles.

Tabla 9. Evaluación de los parámetros organolépticos y físicos del jarabe de vitamina C libre de antioxidantes en función del tiempo.

Jarabe de Vitamina C						
Parámetros	Tiempo (días)					
	1	15	30	60	90	
Organolépticos	Olor	Fresa	Fresa	Fresa	Fresa	Fresa
	Color	Amarillo ++	Amarillo ++	Amarillo ++	Amarillo ++	Amarillo +++
	Sabor	Fresa	Fresa	Fresa	Fresa	Fresa
	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Físicos	pH	3,25	3,22	3,20	3,30	3,20
	Densidad	1,2928	1,2929	1,2931	1,2931	1,2935

Tabla 10. Evaluación de los parámetros organolépticos y físicos del jarabe de vitamina C + antioxidante natural en función del tiempo.

Jarabe de Vitamina C + Antioxidante Natural						
Parámetros	Tiempo (días)					
	1	15	30	60	90	
Organolépticos	Olor	Miel	Fresa/Durazno/ miel	Fresa/Durazno/ miel	Fresa/Durazno/ miel	Fresa/Durazno/ miel
	Color	Amarillo +++++	Amarillo +++++	Amarillo +++++	Amarillo +++++	Amarillo +++++
	Sabor	Miel	Miel /Fresa/ Durazno	Fresa/Durazno	Fresa/Durazno	Fresa/Durazno
	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Físicos	pH	3,46	3,47	3,47	3,48	3,53
	Densidad	1,2612	1,2685	1,2687	1,2684	1,2692

Tabla 11. Evaluación de los parámetros organolépticos y físicos del jarabe de vitamina C + antioxidante sintético en función del tiempo.

Jarabe de Vitamina C + Antioxidante Sintético						
Parámetros	Tiempo (días)					
	1	15	30	60	90	
Organolépticos	Olor	Fresa	Fresa	Ligero a fresa	Ligero a fresa	Ligero a fresa
	Color	Amarillo +	Amarillo +	Amarillo +	Amarillo +	Amarillo ++
	Sabor	Fresa	Fresa	Fresa	Fresa	Fresa/levemente amargo
	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
Físicos	pH	3,37	3,33	3,30	3,34	3,36
	Densidad	1,2941	1,2931	1,2960	1,2948	1,2968

Tabla 12. Control microbiológico

Microorganismos	Especificación	Resultado					
		Libre antioxidante		Ant. Natural		Ant. Sintético	
		0 días	90 días	0 días	90 días	0 días	90 días
Aerobios totales	< 100 ufc/ml	< 100 ufc/ml	< 100 ufc/ml	< 100 ufc/ml	< 100 ufc/ml	< 100 ufc/ml	< 100 ufc/ml
Hongos y levaduras	< 10 ufc/ml	< 10 ufc/ml	< 10 ufc/ml	< 10 ufc/ml	< 10 ufc/ml	< 10 ufc/ml	< 10 ufc/ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

4. Conclusiones

Se elaboraron tres lotes piloto de 16 muestras de jarabe de vitamina C de 30ml a una concentración de 100mg/5ml. El primer lote sin contenido de antioxidante, en el segundo lote se empleó antioxidante natural (extracto hidroalcohólico de las hojas de *Dodonaea viscosa*) y en el tercer lote se utilizó un antioxidante sintético (metabisulfito de sodio).

Se determinó que los factores de estudio: tipo de antioxidante, tiempo y sus interacciones ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre las variables respuesta: concentración de vitamina C y porcentaje de inhibición del jarabe.

En el jarabe las concentraciones de ácido ascórbico obtenidas a los 90 días después de ser sometido a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y 75 ± 5 % de HR fueron: 75,53%; 76,70%,

90,33% para el producto libre de antioxidante, con antioxidante natural y con antioxidante sintético respectivamente, lo cual indica que el metabisulfito de sodio es el antioxidante que mejor preserva al activo, neutralizando con mayor facilidad especies reactivas presentes y evitando la degradación del principio activo.

El producto con mejor capacidad antioxidante es aquel que contiene el extracto hidroalcohólico de *Dodonaea viscosa* mostrando un 96,75% de inhibición de radical DPPH, ello demuestra que existe interacción de adición entre antioxidantes (ácido ascórbico + extracto hidroalcohólico).

No es posible únicamente con la adición del extracto hidroalcohólico de *Dodonaea viscosa* al jarabe evitar la sobredosificación de la forma farmacéutica líquida ensayada, sin embargo se podría considerar su actividad antioxidante como un atributo beneficioso para la salud.

Referencias

- [1] Ocampo, R., Ríos, L., Ocampo, D., & Betancur, L. (2008). Curso práctico de química orgánica (Primera ed.). (L. Escobar Velásquez, Ed.) Universidad de Caldas.
- [2] Gregory III, J. (s.f.). Chemical Changes of Vitamins. En T. Richardson, J. Finley, T. Richardson, & J. Finley (Edits.), Chemical Changes in Food during Processing (págs. 385 - 387). New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- [3] Dhananjay Pujar, M. (Julio de 2012). Dodonaea viscosa flavonoid rich plant and its biological potential.
- [4] Maia, A., Baby, A., Pinto, C., Yasaka, W., Suenaga, E., Kaneko, T., & Robles Velasco, M. V. (2006). Influence of sodium metabisulfite and glutathione on the stability of vitamin C in O/W emulsion and extemporaneous aqueous gel. International Journal of Pharmaceutics, 130-135.
- [5] Criado Dabrowska, C., & Moya Mir, M. (2011). Vitaminas y Antioxidantes. Recuperado el 17 de Febrero de 2017, de Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid: http://2011.elmedicointeractivo.com/Documentos/doc/VITAMINAS_Y_ANTIOX_EL_MEDICO.pdf
- [6] Recalde Armas, S. (2014). Evaluación de la Actividad Gastroprotectora y Antioxidante del Extracto de Croton cajucara Benth. Quito.
- [7] U.S. Food and Drug Administration. (25 de Noviembre de 2014). Guide to inspections oral solutions and suspensions.
- [8] World Health Organization. (2006). International Pharmacopoeia Monograph on liquid preparations for oral use.
- [9] USP 39 NF34. (2016). United Book Press..

Isoconversión Isotermal para una estimación rápida de la vida útil de comprimidos de Ácido acetil salicílico

PAÚL ANDRÉS ESPARZA-NARANJO^a, ROBERT MARTIN ALCOCER-VALLEJO^a,
JAVIER RODRIGO SANTAMARÍA-AGUIRRE^a

^a: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central Ecuador (UCE), Quito, Ecuador

*Correspondencia: jrsantamaria@uce.edu.ec

Recibido: 28 agosto 2017, Aceptado: 20 noviembre 2017

Resumen

Los estudios tradicionales de estabilidad son excesivamente largos y costosos. Alternativamente, se han propuesto métodos más eficientes, entre los que se destaca aquel que usa el paradigma de isoconversión isotérmica para estimar la vida útil en unas pocas semanas, con un importante ahorro de recursos. Este enfoque reconoce a las formas farmacéuticas como sistemas heterogéneos sin un orden cinético único, establece un porcentaje máximo de degradación y asume una misma cinética para todos los procesos de degradación independientemente de las condiciones en las que se lleven a cabo, además incluye en los cálculos el efecto de la humedad mediante una modificación a la ecuación de Arrhenius. El objetivo del presente trabajo fue aplicar la isoconversión isotermal a fin de estimar en pocas semanas la vida útil de comprimidos de Ácido acetilsalicílico. Se realizaron pruebas experimentales para evaluar la eficacia de la isoconversión en la estabilidad del fármaco, incluyendo seis combinaciones de humedad y temperatura para establecer el tiempo necesario para la formación del 0,15 % de ácido salicílico y se calculó la Energía de activación, se aplicó el método de Monte Carlo con 5000 simulaciones que consideran valores de temperatura y humedad relativa dentro de un rango determinado. La vida útil estimada fue 415,5 días para materia prima y 35,6 días para comprimidos. Este método permite evidenciar en corto tiempo el impacto de los excipientes y el proceso de manufactura en la estabilidad de un medicamento.

Palabras clave: isoconversión, vida útil, ácido acetilsalicílico.

Isotermal isoconversion for rapid shelf life estimation of Acetyl salicylic acid tablets

Abstract

Long-term stability studies of pharmaceutical forms require a large amount of resources and time for their development. Alternatively, more efficient methods have been proposed, among these, the paradigm of isothermal isoconversion is highlighted to estimate the useful life in a few weeks. This approach recognizes pharmaceutical forms as heterogeneous systems without a single kinetic order, it establishes a maximum percentage of degradation and assumes the same kinetics for all degradation processes independently of the conditions in which they are carried out, and it also includes in the calculations the effect of humidity through a modification to the Arrhenius equation. The objective of the present investigation was to apply the isothermal isoconversion in order to estimate the shelf-life of the acetylsalicylic acid tablets in few weeks. Six combinations of humidity and temperature were used to establish the necessary time for the formation of 0.15% salicylic acid, being calculate activation energy too, the Monte Carlo method was applied with 5000 simulations considering values of temperature and relative humidity within a certain range. The estimated shelf-life life for raw material was 415.5 days and 35.6 days for tablets. This method demonstrates in a short time the impact of the excipients and the manufacturing process on the stability of a drug.

Keywords: Isoconversion, Shelf life, Acetylsalicylic Acid

1. Introducción

La predicción de la estabilidad de formas farmacéuticas según la ecuación de Arrhenius presenta ciertos inconvenientes: los estudios pueden durar desde seis meses a varios años, se debe establecer un orden de reacción, no siempre se predicen los niveles de degradación reales y no permite cuantificar el efecto de la humedad relativa en los diversos procesos de degradación. Como una estrategia para superar estos problemas se desarrolló, desde los primeros años de la década pasada, un método de predicción de estabilidad en base a la isoconversión isothermal con una modificación de la ecuación de Arrhenius para incluir la humedad relativa. En él se establece un límite de formación de degradante, no se necesita el orden cinético de degradación y genera una predicción de la estabilidad química más confiable y en menor tiempo. A diferencia del modelo tradicional de Arrhenius, reconoce a las formas farmacéuticas en estado sólido como sistemas estructuralmente heterogéneos, con estados cristalinos y amorfos que interactúan de múltiples maneras, mostrando diferentes órdenes de reacción, lo que implica que el orden cinético global sería la suma de los órdenes de los microestados individuales, siendo complejo encasillarlos como de primero, segundo o tercer orden. [1]

El objetivo del presente trabajo fue aplicar el método de isoconversión isothermal a fin de estimar en corto tiempo la estabilidad química de formas farmacéuticas sólidas. Se seleccionó al Ácido acetilsalicílico como molécula modelo en primer lugar, debido a que es sintetizado en Ecuador, y porque sus vías y factores de degradación son ampliamente conocidos. Para conseguirlo se desarrolló y validó un método HPLC indicativo de estabilidad para Ácido Acetil Salicílico y su principal producto de degradación: el Ácido Salicílico, luego se aplicó un protocolo de estudio de estabilidad mediante isoconversión tanto sobre materia prima como sobre comprimidos de Ácido acetil salicílico de 500 mg elaborados para el efecto.

Cinética del estado sólido

En un sistema homogéneo, una solución por ejemplo, la cinética química describe la transformación hacia un producto siguiendo un orden de reacción determinado. En el estado sólido la situación es más com-

plicada por la multiplicidad de estados moleculares no equilibrados y la baja movilidad de las moléculas; en este sistema heterogéneo coexisten varios estados cristalinos y amorfos termodinámicamente diferentes, cada uno con diferentes velocidades de reacción. La constante de velocidad calculada no representará la verdadera velocidad de formación de los productos de degradación [2].

Proponer una expresión matemática que describa la cinética de degradación en los sólidos podría no reflejar lo que realmente le sucede a la muestra. El paradigma de la isoconversión fue aplicado para calcular las constantes de la ecuación de Arrhenius, sin necesidad de determinar el orden de la reacción global [3].

La cinética de conversión puede representarse mediante la relación entre la Temperatura absoluta, T y el grado de conversión, α mediante la Ecuación 1.

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha)$$

Considerando los cambios de la temperatura, es posible utilizar la ecuación de Arrhenius para describir el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción mediante la Ecuación 2.

$$k(T) = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Dónde: \mathbf{K} es la constante de la velocidad; A frecuencia de colisiones; \mathbf{Ea} energía de activación para la conversión química y \mathbf{R} constante de los gases [4].

El grado de conversión, α , puede definirse de diversas formas, ya sea como una disminución de la cantidad de la sustancia de interés o de la generación de un compuesto de degradación.

Donde, \mathbf{C}_0 es la concentración inicial de sustancia y \mathbf{C} es la cantidad de sustancia medida en el tiempo t [5].

Paradigma de la isoconversión

Este modelo permite calcular la energía de activación E_a , en función del grado de conversión, sin establecer un modelo matemático que describa la reacción. A velocidad de conversión constante, la velocidad de

transformación depende únicamente de la temperatura y la humedad relativa [4].

Para aplicar la isoconversión, es necesario establecer un límite de formación de degradante en las muestras, las cuales van a ser expuestas a diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa

durante el tiempo necesario para llegar al límite de degradante establecido.

La relación del grado de conversión (α) en función del tiempo (t), presentaría la misma forma de la curva, teniendo una mayor pendiente a temperaturas más elevadas, Figura 1.

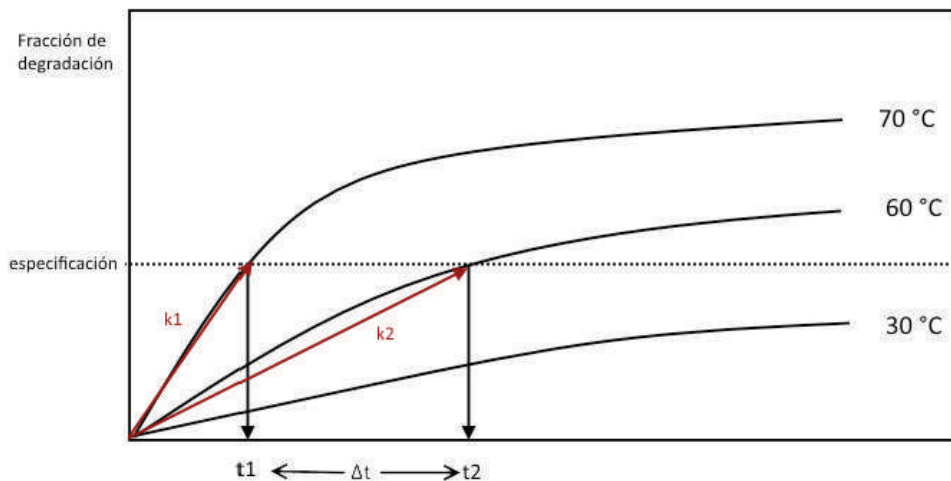


Figura 1. Relación del grado de conversión y el tiempo a varias temperaturas [5].

Si las rectas parten del origen la constante puede ser descrita mediante la ecuación 4, es decir, se puede establecer que la constante de la velocidad es el recíproco del tiempo necesario para alcanzar el límite de formación del degradante; esta constante de velocidad incluye las potenciales contribuciones de las diferentes formas físicas del principio activo.

$$k_i = \alpha_i / t_i$$

Ya que el grado de conversión (α) se mantiene constante para las dos rectas k_1 y k_2 se puede escribir la Ecuación 5.

$$k_1 \cdot t_1 = k_2 \cdot t_2$$

Es posible entonces calcular las constantes de reacción a diferentes condiciones, independientemente de la forma de la curva, siempre y cuando la reacción alcance el límite de degradación establecido [6].

En la cinética heterogénea, propia de las formas farmacéuticas sólidas, la velocidad de la formación de

degradantes a una tasa de conversión constante se debe principalmente a factores que afectan la movilidad de las moléculas y no influyen en la determinación de las energías de activación [1].

En los estudios de estabilidad tradicionales la formación del degradante no es lineal en función del tiempo y la velocidad varía con el grado de conversión, resultando que la constante de velocidad en cualquier condición no refleja el verdadero grado de conversión, por las cantidades variables de principio activo presentes. Mediante la aplicación de la isoconversión la constante de velocidad a cada condición de almacenamiento tendrá las mismas contribuciones relativas del estado sólido, porque se establece un límite de formación del degradante [2].

Para un amplio rango de humedades relativas a las cuales podría ser expuesto el fármaco, se ha determinado que la degradación química se puede expresar mediante el uso de la ecuación modificada de Arrhenius, ecuación 6.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} + B(\%HR)$$

Dónde: B es una constante indicativa de la sensibilidad a la humedad de un sistema en particular y % HR es la humedad relativa en equilibrio. La sensibilidad a la humedad de las reacciones no determina los procesos hidrolíticos involucrados. El rango de valores de B es de 0 a 0,09 [1]. Se observa que existe una relación exponencial entre la humedad relativa y la degradación del principio activo, la humedad relativa afecta a la velocidad de reacción mediante una alteración en la movilidad molecular, por tanto, afecta la frecuencia de colisión de las moléculas, pero no la energía de activación [1].

2. Parte experimental

Materiales

El estudio utilizó Ácido acetilsalicílico, con una pureza de 100,3%, sintetizado en Ecuador por DAN QUIMICA C.A. Como excipientes para los comprimidos: Croscarmelosa sódica, Acido esteárico, Dióxido de silicio coloidal y Celulosa Microcristalina. La columna cromatográfica fue una Altech C18 (5um) de 250mm x 4,6mm.

Equipos

HPLC Dionex Ultimate 3000, estufas Memmert, Binder y Thelco, balanza de humedad Mettler Toledo HX204, tableteadora rotativa Riva Piccola de 10 estaciones.

Métodos

Desarrollo y Validación de un método HPLC indicativo de estabilidad para ácido acetilsalicílico y su principal producto de degradación el ácido acetilsalicílico

Se especificaron las condiciones esperadas del método analítico: tiempo de corrida máximo de 10 mi-

nutos, Atura del pico menor a 1 Unidad de absorbancia, asimetría menor a 2, presión de la columna menor a 3000 psi, resolución mínima de 2,0. Las condiciones iniciales se establecieron en base a los métodos publicados disponibles y se modificarán de uno en uno y secuencialmente el Flujo de la fase móvil: 0,8 – 1,5 mL/min. y la composición de la fase móvil: acetonitrilo y buffer pH 2,25. Para la validación del método analítico se tomaron como referencia las normas de BPM (Anexo 1, Informe 32), las guías ICH Q1AR2 [7].

Elaboración de comprimidos de 500 mg de ácido acetilsalicílico por compresión directa

Al igual que en el desarrollo del método se aplicó el método Heurístico, la formulación inicial y las especificaciones se establecieron en base a experiencias previas del laboratorio y a la literatura: Dureza mayor a 5 kgf, Peso medio de 900 mg (95 – 105%), espesor de 6,80 a 6,90 mm, Desintegración en agua a 37°C menor a 30 minutos, friabilidad máxima de 0,5%.

Diseño Experimental:

Estudio de estabilidad aplicando isoconversión

Mediante la utilización de la ecuación modificada de Arrhenius, es posible establecer la constante cinética de la reacción en función de la temperatura y la humedad relativa. Ya que esta ecuación presenta 3 constantes: E_a , A y B y dos variables: temperatura y humedad relativa; el mínimo número de experimentos que se requiere para resolverla es 3, siendo necesario incrementar el número de puntos para mejorar la precisión de las mediciones, razón por la cual se aplicó el protocolo general establecido en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo para en ensayo de estabilidad de formas farmacéuticas sólidas.

T, °C	% RH	Días (muestras 1)	α_1	Días(muestras 2)	α_2
50	75	4	a1	14	a1'
60	5	14	a2	21	a2'
60	40	4	a3	21	a3'
70	5	4	a4	21	a4'
70	75	1/3	a5	2	a5'
80	40	1/3	a6	4	a6'

(Alcocer, 2016)

Donde α_1 y α_2 , son los valores experimentales de degradación, que se esperan obtener en las condiciones establecidas de temperatura y humedad relativa dentro de un determinado tiempo. Estos datos se usan para calcular el tiempo de isoconversión en cada condición: (1) en primer lugar, se puede trazar una línea a través de los datos para encontrar la intercepción con la especificación límite. (2) Los dos puntos más cercanos al límite de la especificación, pueden ser usados para interpolar o extrapolar el tiempo para llegar a la especificación, (3) Un único punto más cercano a la especificación, puede ser usado para determinar $k = \alpha/t$ [8].

Para establecer la relación entre las variables con la degradación se usó la ecuación modificada de Arrhenius en su forma lineal.

Cálculos y tratamiento estadístico

El cálculo de las constantes en la ecuación modificada de Arrhenius para la humedad está asociado a un valor de imprecisión proveniente de las mediciones. Además, la extrapolación en los ejes de temperatura y humedad incorpora otro factor de imprecisión. Realizar un procedimiento de propagación de errores en la ecuación modificada de Arrhenius sería matemáticamente complicado, por lo que, en su lugar, se utilizó una aproximación mediante una simulación matemática: el método Monte Carlo, que proporciona variaciones a cada temperatura y humedad relativa, dentro de cierto rango establecido, y realiza un ajuste de mínimos cuadrados con todas las combinaciones posibles [3]. En la aplicación de la simulación de Monte Carlo, se asume una distribución Normal y su desviación estándar. Esta simulación en computadora comprende 5000 combinaciones de temperatura

y humedad con el fin de construir límites de confianza para la degradación [2].

3. Resultados y discusión

Desarrollo y Validación de un método HPLC indicativo de estabilidad para Ácido Acetil Salicílico y su principal producto de degradación el Ácido Salicílico.

El estándar de ácido acetilsalicílico se preparó pesando 81,25 mg del estándar secundario de ácido acetil-salicílico en un balón aforado de 25 mL, se adicionó 1,0 mL de acetonitrilo y se agitó hasta disolver.

Para el estándar de ácido salicílico se pesó 60,94 mg de estándar secundario de ácido salicílico en un balón aforado de 25 mL, se adicionó 1,0 mL de acetonitrilo, y se aforó con fase móvil.

Con los dos anteriores se preparó el estándar combinado. En el balón del estándar de ácido acetilsalicílico se adicionó 1 mL de la solución de estándar de ácido salicílico y se aforó con fase móvil. Se tomó una alícuota de 1 mL en un balón de 10 mL y se aforó con fase móvil. Se filtró por un filtro PVDF 0,45 μ m y se inyectó. La concentración ácido acetilsalicílico fue de 0,325 mg/mL y la de ácido salicílico 0,00975 mg/mL.

Para las muestras se trituró en un mortero 5 comprimidos de ácido acetilsalicílico y se pesó el equivalente a 81,25mg de aspirina en un balón aforado de 25 ml, se adicionó 1,0 ml de acetonitrilo y agitó manualmente durante 10 minutos, se añadió 20 ml de fase móvil y se aforó con fase móvil. Una alícuota de 1 ml se colocó en un balón aforado de 10 mL y se aforó con fase móvil. Antes de inyectar filtrar por un filtro PVDF 0,45 μ m.

Tabla 2. Resultados de la Validación del Método Analítico Condiciones cromatográficas

Parámetro	Condición de operación
Columna	Altech C18 5 μ m de 250mm x 4,6mm
Temperatura de la columna	30 +/- 5°C
Fase móvil	Buffer KH ₂ PO ₄ pH 2,25: Acetonitrilo (75:25)
Flujo	1,5 mL/min
Detector	DAD
Volumen de inyección	10 μ L
Temperatura de muestras	5 +/- 2°C
Longitud de onda	235 nm

Los parámetros, criterios de aceptación y resultados de la Validación fueron: Todos los parámetros cumplen con lo esperado para un método analítico

indicador de estabilidad del Ácido Acetil salicílico como materia prima y en comprimidos.

Tabla 3. Resultados de la Validación del Método Analítico

Parámetro de validación	Variable / Medida	Criterio de aceptación	Resultado
Especificidad	Solvente	Ausencia de picos que interfiera con el analito.	Cumple
	Placebo	Ausencia de picos que interfiera con el analito.	Cumple
	Degradación en medio ácido	Los tiempos de retención de los picos de las degradaciones no deben interferir con el tiempo de retención del pico del analito de interés	Cumple
	Degradación en medio básico		Cumple
	Degradación por oxidación		Cumple
	Degradación por calor		Cumple
Precisión del Sistema	Coefficiente de variación	Máx. 2,0%	1,51%
Linealidad del método	Coefficiente de correlación	Mayor a 0.99	ASA: 0,9992 AS: 0,9995
Exactitud	Coefficiente de variación	Máximo 2,0%	ASA:1,32 AS:1,56
	Porcentaje de recuperación	98.0 – 102.0%	ASA:99,4% AS:98,3%
Repetibilidad	Coefficiente de variación	Máximo 2,0%	ASA: 1,17 AS:1,96
	Porcentaje de recuperación	Según especificación del producto	99,5%
Precisión intermedia	Coefficiente de variación	Máximo 2,0%	ASA: 1,17 AS:1,96
	Porcentaje de recuperación	Según especificación del producto	99,5%
Estabilidad de soluciones analítica	Porcentaje de desviación	Max. 2.0% con respecto al valor inicial	Máximo 3 horas de la preparación
LOD	Relación (Señal: Ruido)	Mínimo (3:1)	ASA: 59:1AS: 15:1
LQD	Relación (Señal: Ruido)	Mínimo (10:1)	ASA: 59:1AS: 15:

Fuente: Elaborado por Esparza Paúl 2017-06

Los tiempos de retención fueron 6,4 minutos para el pico del ácido acetilsalicílico y 8,8 minutos para el de ácido salicílico.

Elaboración de comprimidos de 500 mg de ácido acetilsalicílico por compresión directa

A través del desarrollo se llegó a la siguiente formulación de comprimidos de ácido acetilsalicílico para compresión directa.

Tabla 4. Fórmula de comprimidos de ASA mediante compresión directa

N	Ingredientes	mg/Tableta	Porcentaje p/p
1	Ácido acetilsalicílico	500	55,56
2	Avicel pH 102	373	41,44
3	Croscarmelosa Sódica	18	2,00
4	Aerosil	4,5	0,50
5	Ácido esteárico	4,5	0,50
	Total	900	100,00

Los resultados de los parámetros físicos del lote de 200 g fueron los siguientes:

Tabla 5. Especificaciones y resultados de los comprimidos

Especificaciones	Resultado	
Diámetro (mm)	13,00 mm (12,50 - 13,50 mm)	13,04 mm
Espesor (mm)	6,80 mm (6,6 - 7,0 mm)	6,82 mm
Peso (mg)	900 mg (810,0 – 990,0 mg) (90,0 – 110,0) %	928,8 mg
Dureza	Mínimo de 5kgf	10,8 kgf
Friabilidad	Máximo de 0,80%	0,21 %
Desintegración	Máximo 30 minutos (Agua purificada a 37 °C)	0,5 minutos

Estudio de estabilidad aplicando isoconversión isotermal

Para la estimación de la estabilidad aplicando isoconversión, primeramente se sometió a las muestras de

materia prima, tal como fue entregada por el fabricante, y los comprimidos a las condiciones de temperatura y humedad descritas en la parte metodológica, durante siete días.

Tabla 6. Porcentaje de Ácido Salicílico a los siete días en Materia Prima

T, °C	Materia prima		
	% HR	t, (días)	% Ácido salicílico.
40	90	7	0,082
60	90	7	0,107
80	90	7	0,684
40	70	7	0,079
60	15	7	0,047
80	15	7	0,056

Tabla 7. Porcentaje de Ácido Salicílico a los siete días en Comprimidos.

Comprimidos			
T, °C	% HR	t, (días)	% Ácido salicílico
40	90	7	0,18%
60	90	7	0,76%
80	90	7	17,7%
40	70	7	0,77%
60	15	7	1,07%
80	15	7	0,52%

En base a los resultados anteriores se calculó el tiempo necesario para llegar al porcentaje máximo de degradación a cada condición.

Tabla 8. Porcentaje de Ácido salicílico en Materia prima, a diferentes tiempos de tratamiento.

Materia prima			
T, °C	% HR	t, (días)	% Ácido salicílico
40	90	9	0,105%
60	90	7	0,024%
80	90	2	0,195%
40	70	15	0,170%
60	15	15	0,100%
80	15	15	0,119%

Tabla 9. Porcentaje de Ácido Salicílico en comprimidos, a diferentes tiempos de tratamiento

Comprimidos			
T, °C	% HR	t, (días)	% Ácido salicílico.
40	90	9	0,760%
60	90	7	0,248%
80	90	6	5,076%
40	70	15	1,654%
60	15	15	1,095%
80	15	15	1,157%

Cálculo de la vida útil del ácido acetilsalicílico

Con los resultados de degradación, se calculó el tiempo necesario para alcanzar el porcentaje máximo de

degradación y con él se calculó la constante de degradación K. Con los valores de temperatura, humedad y lnK se realizó una regresión lineal multivariable para la ecuación modificada de Arrhenius [5].

Tabla 10. Datos utilizados en la regresión lineal multivariable para Materia Prima.

T °C	% HR	Días	% AS	K	Ln K
60	90	7	0,105	0,015000	-4,19970508
40	90	9	0,024	0,002667	-5,92692603
80	90	2	0,195	0,097500	-2,3279029
40	70	15	0,170	0,011333	-4,48000704
60	15	15	0,100	0,006667	-5,01063529
80	15	15	0,119	0,007933	-4,83668199

Las condiciones que incluían humedad del 90% generaron cristalización del Ácido acetil salicílico por lo que la cantidad determinada de ácido salicílico

no era representativa de toda la muestra. La tabla siguiente presenta los resultados de la regresión lineal multivariable excluyendo las condiciones a 90% HR.

Tabla 11. Resultados de la regresión lineal multivariable.

	Ea / R	B
Materia Prima	-1774,35	0,017
Comprimidos	-947,46	0,012

Se evidenció que a 90 % de humedad relativa se formaron grandes cristales aciculares tanto en la materia prima como en los comprimidos, fenómeno que no ocurrió a 70% de humedad relativa. No es de esperarse que este tipo de cambio se presente en condiciones normales de almacenamiento, por lo que considerar estos datos en el cálculo genera un error. Los cristales se forman por la condensación en la superficie de las partículas, generando un proceso de recristalización del ácido acetilsalicílico.

Con la ecuación anterior se realiza una simulación para 5000 valores aleatorios entre 20 - 30°C y 55 - 65% HR que son las temperaturas de almacenamiento esperadas, pero que puede modificarse según las condiciones específicas de donde se realice el estudio y considerando las zonas climáticas descritas por la ICH [7]. Por facilidad de visualización los datos

se grafican como un histograma representado en la siguiente figura.



Figura 2. Resultado de la simulación para la Materia Prima.

La estadística descriptiva de esta población de datos es la siguiente:

Tabla 12. Estadística descriptiva de la simulación para la materia prima

Media	415,52
Moda	380,40
Mediana	414,00
Desviación estándar	32,65
Curtosis	-0,59
Mínimo	348,67
Máximo	494,07

Los valores de la vida media (en días) calculados para materia prima fueron 415,5 (348,7-494,1) y para los comprimidos 35,6 (32,0-39,5).

El uso de un modelo libre como el isoconversional en la predicción de la estabilidad de una forma farmacéutica sólida mediante un protocolo general, es útil para determinar cuantitativamente el grado de incompatibilidad entre principio activo y excipientes.

Las condiciones más adecuadas de humedad relativa y temperatura se van determinando paulatinamente para poder establecer y aplicar un protocolo adecuado para la determinación del tiempo de vida útil de una forma farmacéutica sólida.

La presencia de ácido esteárico en la formulación de los comprimidos aumenta la velocidad de formación del ácido salicílico, ya que el uso de estearatos inducen a un cambio del pH de un medio ácido a un medio básico, incrementando la velocidad de formación del ácido salicílico.

El ácido acetilsalicílico al ser expuesto a una alta humedad genera un campo hidrofílico alrededor de

los cristales, según fue descrito por Mitrevej y Hollenbeck [9]; y al combinar este principio activo con desintegrantes hidrofílicos, como la croscarmelosa sódica, se induce una condensación próxima a los cristales de ASA, aumentando la velocidad de formación de ácido salicílico. Otro factor importante que hay que tener en cuenta es el grado de penetración del agua al núcleo del comprimido, el cual depende del tipo desintegrante y la concentración del mismo, como ya se mencionó en la formulación se usó la croscarmelosa sódica en una concentración del 2% p/p.

La formulación utilizada incluyó ácido esteárico, croscarmelosa sódica (desintegrante hidrofílico), celulosa microcristalina, en proporciones similares al del estudio: "Formulation of Acetylsalicylic Acid Tablets for Aqueous Enteric Film Coating". previendo un acelerado proceso de degradación y un bajo tiempo de estabilidad [9].

Una restricción de este tipo de estudio es que si bien considera la temperatura y asigna la importancia adecuada a la humedad relativa en función de la movilidad molecular, no se considera la cristalinidad. Como se conoce, la movilidad molecular y por tanto la magnitud del factor de colisiones A, depende de si se trata de un sólido amorfo o cristalino, y entre estos últimos según el tipo de polimorfo y la solvatación. En futuros estudios se debería controlar este factor para cuantificar su efecto.

4. Conclusiones

Se desarrolló y aplicó un protocolo para estimar la vida útil de ácido acetilsalicílico usando isoconversión isoterma. La estabilidad química calculada fue: 415,5 días para el principio activo y 35,6 días para los comprimidos, mostrando la rápida transformación del ácido acetilsalicílico en ácido salicílico en los comprimidos en la formulación utilizada.

El método aplicado permite evidenciar en corto tiempo el impacto de los excipientes, el proceso de manufactura y otros factores en la estabilidad de un medicamento. Para el caso en estudio el efecto de los excipientes utilizados es dramático, la vida útil estimada para los comprimidos es 12 veces menor que para la materia prima.

Bibliografía

- [1] Waterman (2002). Improved Protocol and Data Analysis for Accelerated Shelf-Life Estimation of Solid. Pfizer Inc, 3-5.
- [2] Waterman (2007). Improved Protocol and Data Analysis for Accelerated Shelf-Life Estimation of Solid Dosage Forms. *Pharmaceutical Research*, z4(4), 780-790.
- [3] Huynh (2009). *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development* (primera ed.). New York: Springer.
- [4] Vyazovkin (2015). *Isoconversional Kinetics of Thermally Stimulated Processes*. Alabama: University of Alabama. Research, 4-5.
- [5] Alcocer R., Santamaría, J. (2016). Isoconversión, un método efectivo en la estimación del tiempo de vida útil de formas farmacéuticas sólidas. *Química Central* 5 (1):41-58
- [6] Porter (2013). Degradation of Pharmaceutical Solids Accelerated by Changes in Both Relative Humidity and Storage Temperature and Combined Storage Temperature and Storage Relative Humidity Design Space for Solid Products. *Institute of Validation Technology*, 73-92.
- [7] ICH. (2003). Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Orckville Pike: ICH.
- [8] Waterman (2014). A Scientific and Statistical Analysis of Part 1: Accuracy of Fitting Methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3000-3006.
- [9] Cunningham (2001). Formulation of Acetylsalicylic Acid Tablets for Aqueous Enteric Film Coating. *Pharmaceutical Technology Europe*, 44-53.

Determinación de la eficiencia de un producto fijador para la protección de tintas ferrogálicas

ARIEL VIZCAÍNO¹, TROSKY YÁNEZ² *, PABLO BONILLA³

1. Universidad Central del Ecuador, Acervo Histórico, Laboratorio Análisis Químico.
2. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Química Orgánica.
3. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Nanotecnología.

Correspondencia: tgyanez@uce.edu.ec, ariwy90@hotmail.com

Recibido: 8 septiembre 2017. Aceptado: 20 noviembre 2017

Resumen

El objetivo de esta publicación es divulgar los resultados de la formulación y evaluación de un fijador alternativo de tintas ferrogálicas desarrollado en el Área Histórica de la Universidad Central del Ecuador, el mismo que es utilizado para proteger el contenido de documentos patrimoniales. Se usó como componentes al poliestireno, di(2-etil-hexil) ftalato (DOP) y aceite de naranja, evitando así el empleo de solventes aromáticos. Para su evaluación se cuantificó el contenido de hierro mediante absorción atómica presente en el agua residual del tratamiento que regula el pH de un documento, obteniéndose como resultado que no se determinaron contenidos de hierro en los escritos en los que se aplicó el fijador. También se analizó el efecto del fijador en los documentos considerando el antes y después del uso del fijador, con la utilización de una encuesta evaluada por 20 expertos en conservación, en la que se examinaron parámetros como el color e intensidad de la escritura, presencia de brillo y de sustancias extrañas, concluyendo que el 82% de los encuestados no observaron cambios en el color e intensidad, el 83% estableció que no existe brillo al aplicarse el fijador y finalmente el 77% señaló que existe reducción en la presencia de manchas.

Palabras clave: Tintas ferrogálicas, fijador de tinta, poliestireno, dioctil-ftalato, aceite de naranja.

Determination of the efficiency of a fixing product for the protection of iron-gall inks

Abstract

The objective of this publication is to disseminate the results of the formulation and evaluation of an alternative fixer of iron-gall inks developed in the Historical Area of the Central University of Ecuador, which is used to protect the content of patrimonial documents. Polystyrene, di (2-ethylhexyl) phthalate (DOP) and orange oil were used as components, thereby avoiding the use of aromatic solvents. To evaluate it, the iron content was quantified by atomic absorption, present in the residual water of the treatment that regulates the pH of a document, as a result, iron contents were not found in the documents in which the fixer was applied. The effect of the fixer on the documents was also analyzed considering a before and after use of the fixer, a survey administered to 20 conservation experts, in which parameters such as the color and intensity of the documents, presence of brightness and foreign substances, concluded that 82% of the respondents did not observe changes in color and intensity, 83% affirmed there is no shine when applying the fixer, and finally 77% determined a reduction in the presence of spots.

Keywords: Inks, ink fixer, polystyrene, dioctyl phthalate, orange oil.

1. Introducción

Uno de los aspectos más preocupantes y que afectan específicamente a la información contenida en los documentos, es la presencia de humedad que genera la aparición de microorganismos, así como el deterioro de las tintas que puede producir o acelerar efectos corrosivos en el soporte por acidez de la tinta, contribuyendo a la hidrólisis y/o degradación oxidativa de la celulosa.

Durante el proceso de conservación y/o restauración de libros, se llevan a cabo diversos tratamientos que se deben hacer al documento para evitar, mitigar o eliminar las afectaciones señaladas, pudiendo ser estos procesos acuosos y no acuosos [1]. Cuando se debe someter al documento a un tratamiento acuoso, como lavados con soluciones buffer que regulan el pH en el papel, si hay presencia de tinta ferrogálica, es necesario la protección de la misma debido al desprendimiento del hierro por su solubilidad en compuestos polares.

Actualmente para la protección de la tinta ferrogálica [2] [3] se utiliza un tipo de resina acrílica conocida comercialmente como Paraloid B-72 [4], el cual da la protección no solo a tintas acuosas, sino también a objetos de cerámica que entran a procesos de conservación [5]. La gran dificultad que presenta este fijador es que la resina acrílica es soluble en compuestos orgánicos levemente polares, siendo así necesario el uso de compuestos muy tóxicos como el xileno, tolueno y thinner [6], al igual que otros fijadores usados en menor grado como el acetato de celulosa y el acetato de polivinilo que también son solubles en solventes tradicionales como la acetona o el xileno.

Por este motivo en esta investigación, se buscó formular y evaluar un producto fijador alternativo que contenga sustancias menos tóxicas, permitiendo una adecuada protección de las tintas ferrogálicas durante una etapa acuosa de tratamiento como la regulación de pH, y tomando en cuenta la estética y la textura que puede dejar sobre el documento al final.

Se ha elegido el poliestireno [10] como un polímero de bajo costo que puede resultar estable, ligero y traslúcido para el efecto, junto con el di(2-etil-hexil) ftalato o llamado comercialmente dioctil-ftalato (DOP) [11] que es usado como plastificante, el cual permite mejorar la flexibilidad del polímero, y el aceite de naranja [7] [8] [9] como solvente alternativo de baja toxicidad para la mezcla de las sustancias.

2. Materiales y Métodos

Para la determinación de hierro que puede aparecer desprendido en el líquido usado en los procesos de lavado de un documento, se utilizaron treinta hojas de papel de pasta química o "papel bond" tomadas como la totalidad de la muestra, y para el levantamiento de la encuesta se aplicó el producto fijador en un documento proporcionado por el Área Histórica, sobre el cual veinte personas expertas en conservación pertenecientes al Área Histórica del Archivo General de la Universidad Central, Casa de la Cultura Ecuatoriana y Ministerio de Cultura, valoraron la estética del documento antes y después de su aplicación.

Etapa I:

Se realizaron diversas combinaciones en la preparación del producto fijador variando la concentración del poliestireno tomado como capa protectora, al DOP como plastificante y al aceite de naranja como solvente, hasta encontrar la concentración adecuada a través de un diagrama de fases, evaluando que fije la tinta con el soporte, que no deje manchas en las hojas al aplicarse y considerando que la textura tampoco sea alterada.

Etapa II:

Se preparó tinta ferrogálica de composición definida usando los materiales básicos que son conocidos bibliográficamente, como el extracto de taninos, sulfato ferroso, goma arábiga y agua [12]. Se tomó un mililitro de tinta ferrogálica preparada y se aplicó en hojas de "papel bond" con la ayuda de un pincel número 1, se repitió este proceso en un total de treinta hojas. Una vez seca la tinta se procedió a consolidar con el fijador alternativo en un total de quince hojas, para continuar con la simulación del proceso de lavado tradicional realizado en los tratamientos de conservación, considerando que el pH del agua este cercano a 7, su temperatura sea la de laboratorio y el tiempo de sumergido de 5 minutos. Concluido ese tiempo se tomó una muestra del agua al final de este proceso y se procedió a determinar el hierro presente en el líquido por el método de absorción atómica, el cual es un método de análisis que esta validado y acreditado en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

Etapa III:

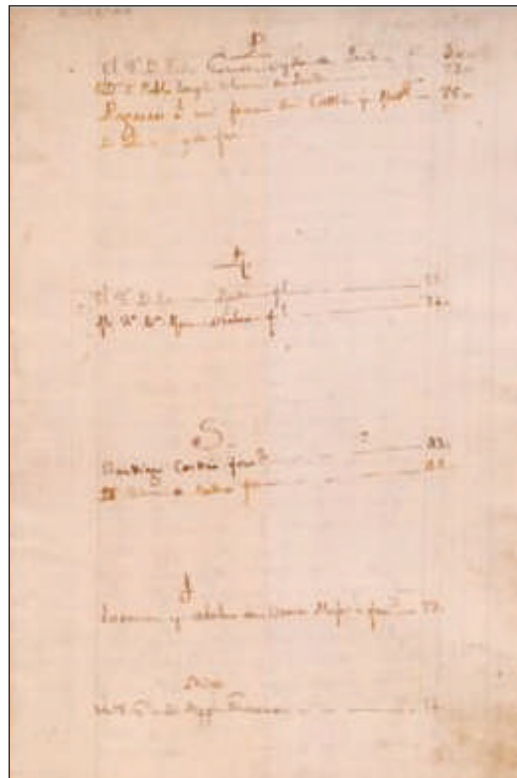
Se obtuvo un documento del archivo proporcionado por el Área Histórica de la Universidad Central del Ecuador, el cual fue fotografiado mediante un equi-

po de barrido digital marca **Scan Diva** en un área determinada antes de aplicar el fijador y se volvió a realizar el barrido digital reproduciendo las mismas condiciones (distancia, ángulo, área) de la fotografía anterior una vez que se aplicó el producto fijador. Posteriormente se presentó una encuesta con tres pares de fotografías para que sea evaluado en función del cambio de color e intensidad de la grafía, pre-

sencia de brillo en la grafía, y la presencia de sustancias extrañas (desprendimiento de hierro alrededor de la grafía incluido manchas) antes y después de aplicar el fijador (Fig. 1). Estos parámetros de evaluación fueron sugeridos por los propios expertos en conservación como los más relevantes al momento de analizar la alteración de un documento por la acción de un fijador.



Fotografía "antes" (Sin fijador)



Fotografía "después" (Con fijador)

Figura 1. Ejemplar de un par de fotografías evaluando mediante la encuesta a expertos.

En esta etapa de valoración cualitativa, la encuesta fue entregada a 20 personas involucradas en el proceso conservación de documentos y de pinturas, para que asigne un parámetro de calidad del documento respecto al color y presencia de brillo en la grafía y presencia de cuerpos extraños incluido manchas.

Cada parámetro tiene un valor arbitrario que va de 1 (No existe diferencia) hasta 5 (Completamente diferentes), Tabla 1.

Cada uno de estos valores arbitrarios se multiplica por el número de encuestados (20 expertos) para obtener así el valor total para cada parámetro (rango de valor).

Tabla 1. Relación de los parámetros de la encuesta con un rango de valores.

Parámetro	Valor Arbitrario	Numero de encuestados	Rango de valor
No existe diferencia	1		20-39
Poca diferencia	2		40-59
Mediana diferencia	3	20	60-79
Alta diferencia	4		80-99
Completamente diferente	5		100

3. Resultados y Discusiones

Etapa I:

Para la determinación de cada componente del fijador alternativo se tomó en cuenta que estos no causen manchas al momento de aplicarlo en el documento una vez que este seco, y que además no cambie la coloración de la tinta, siendo la composición ideal del fijador de 1% poliestireno y 0.6% de DOP.

Etapa II:

Durante el proceso de lavado se pudo apreciar que los documentos en los que se aplicó el fijador, la

tinta no entró en contacto directo con el agua por alrededor de 4 min, esto es debido a que el fijador tiene una acción impermeabilizante. También se observó que al momento de retirar el documento del agua no quedan residuos de la tinta (Fe) en el fondo del recipiente, esto se cumple para aquellos documentos que fueron tratados con el fijador alternativos figura 2- A, al contrario de los documentos en los que no se utilizó el fijador figura 2-B donde se aprecia fragmentos negros en la parte inferior de la fotografía. Esto ocurre debido a que los documentos sin tratamiento tienen un contacto directo con el agua lo cual provoca que la tinta sea fácilmente desprendida.

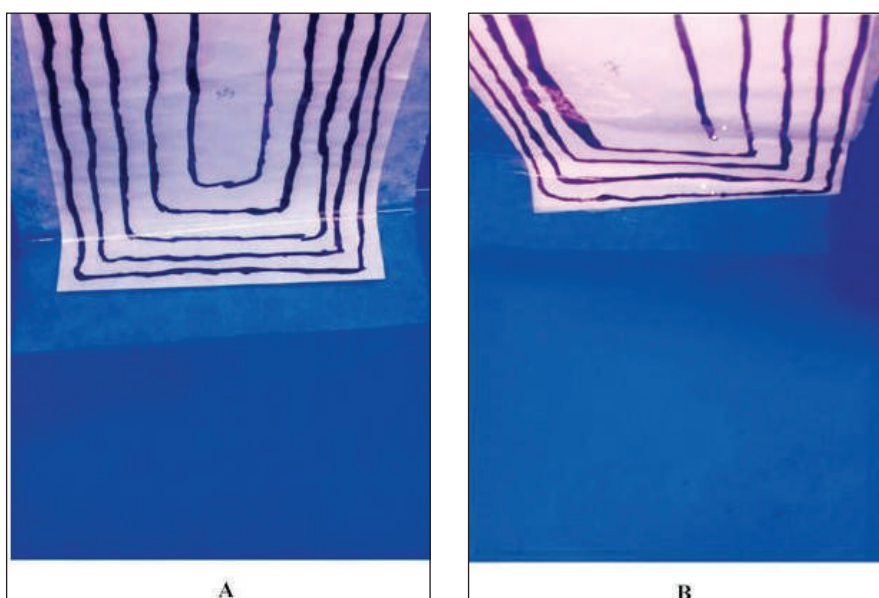


Figura 2. Documento una vez sometido al lavado.

Cabe señalar que una vez que el documento sometido al proceso de lavado para el control del pH se seca, también se aprecia el desprendimiento de tinta ferrogáfica en el papel por la aparición de una cierta escarcha metálica esparcida en su superficie, este hecho fue valorado en la encuesta al preguntar si el experto ve la presencia de cuerpos extraños en el documento.

Adicionalmente para establecer cuantitativamente el desprendimiento de hierro en el agua de lavado se recolectaron 30 muestras que fueron analizadas por el método de absorción atómica, método instrumental validado que posee un límite de cuantificación de 0.07 ppm y un coeficiente de correlación de 0.998. En este análisis los resultados promedio obtenidos para los documentos sin fijador fueron de un valor de

0.27 ppm de hierro con una desviación estándar de 0.06 ppm, y por debajo del límite de cuantificación del equipo cuando se utilizó el fijador alternativo.

Etapa III:

• Color e intensidad de la grafía

La diferencia de color en la grafía obtuvo en puntaje final promedio para las fotografías presentadas de 50 puntos, al ubicar este valor en la tabla 1, se establece el parámetro para esta característica como "Poca diferencia", es decir existe poca diferencia entre el antes y después del tratamiento de conservación con la utilización de fijador, hecho evaluado usando fotografías reales de un libro.

En la figura 3 se puede observar los resultados de la encuesta a expertos para este parámetro, realizado en los tres pares de fotografías. En este análisis se observa que los encuestados asignaron valores de 85%; 65% y 95% (promedio 82%) a aquellas imágenes que corres-

ponden al documento tratado con fijador y que presentan una mayor tonalidad en la grafía en comparación a los documentos que no recibieron este tratamiento. Los pares de fotografías tratadas con fijador corresponden a las B, A y B de la figura 3 respectivamente.

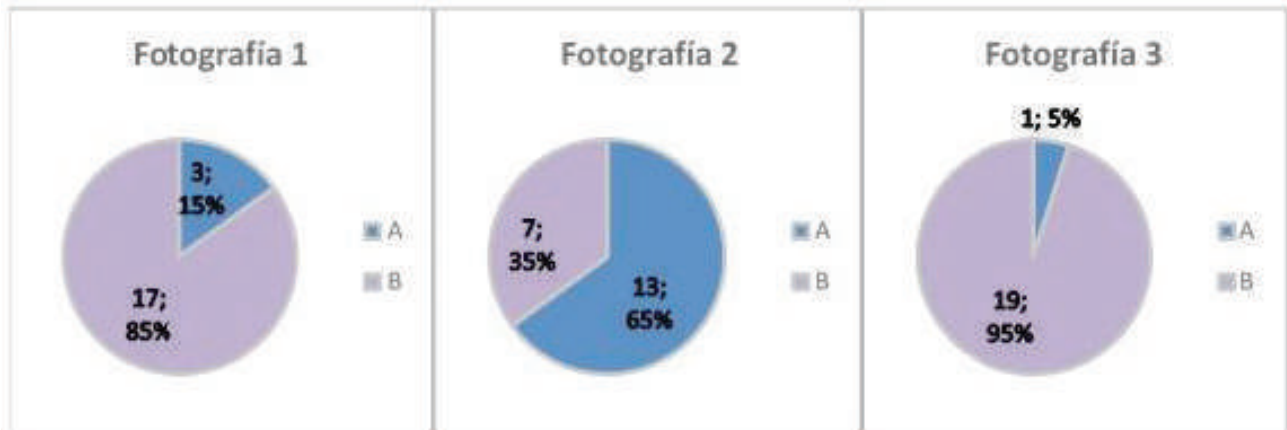


Figura 3. Fotografía con mayor intensidad de color en caligrafía.

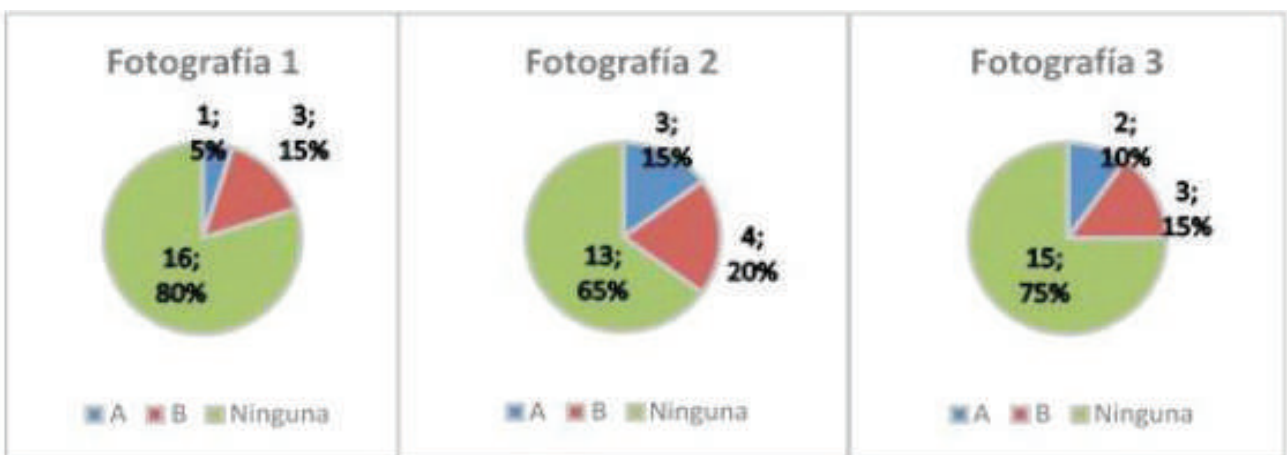


Figura 4. Evaluación del brillo en las fotografías antes y después del fijador.

- Presencia de brillo en la grafía
La presencia de brillo en la grafía obtuvo en puntaje final promedio para las fotografías presentadas de 30 puntos, al comparar este valor con la tabla 1, se establece que el parámetro para esta característica es de "No existe diferencia", es decir no hay diferencia entre el antes y después del tratamiento de conservación ("ninguna diferencia": 80%, 65%, 75%) figura 4.
- Presencia de sustancias extrañas
Finalmente la evaluación sobre la presencia de sustancias extrañas obtuvo en puntaje final

promedio para las fotografías presentadas de 42 puntos, al ubicar este valor en la tabla 1, se establece el parámetro para esta característica como "Poca diferencia", es decir existe poca diferencia entre el antes y después del tratamiento de conservación con la utilización del fijador.

En la figura 5 se ilustra el resultado de los expertos respecto a la presencia de manchas o suciedad. En este análisis se observa que los encuestados asignaron valores de 60%, 85% y 85% (promedio 77%) para las fotografías A, B y A respectivamente, que corresponden a

las instantáneas de los documentos que fueron tomados antes de realizar la fijación de la tinta.

Esta diferencia respecto a la apreciación de las fotografías posteriores a la aplicación del

fijador según los encuestados permite concluir que al someter el documento al proceso de lavado las manchas son eliminadas.

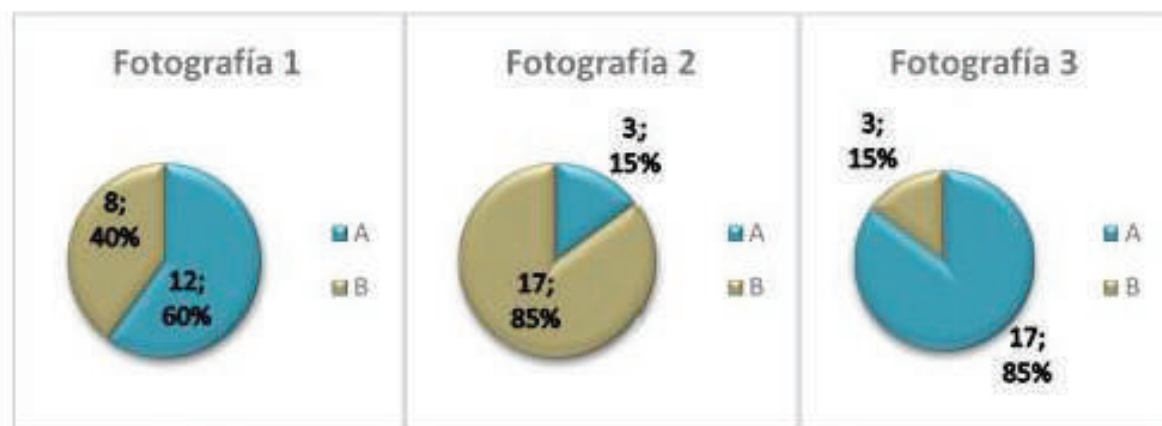


Figura 5. Porcentajes de sustancias extrañas en los documentos.

4. Conclusiones

- La formulación ideal del producto fijador de tintas ferrogálicas se elaboró con 1% de poliestireno, 0.6% de di(2-etil-hexil) ftalato (DOP) y aceite de naranja como solvente, lo cual modifica sustancialmente la composición de los productos tradicionalmente usados para este efecto sobre todo el empleo de solventes aromáticos.
- La evaluación de la eficiencia del producto por el método de absorción atómica fue adecuado y confiable ya que permitió determinar la cantidad de hierro desprendido en el líquido de lavado, cuando los documentos tratados están con y sin fijador. En esta valoración se determinó un valor promedio de 0.27 ppm para las muestras líquidas provenientes de documentos sin fijador e indeterminado o sea debajo del límite de cuantificación del equipo, para aquellas muestras líquidas en las cuales si se aplicó el producto de sujeción.
- Los resultados obtenidos en la encuesta de evaluación del cambio de color e intensidad en la gráfica, fue que existe poca diferencia entre los pares de fotografías tomadas antes y después de la aplicación del fijador respecto al color de la escritura, y que se observa mayor tonalidad en aquellas tomadas después del proceso de fijación con un valor de aceptación promedio del 82%.
- Los resultados alcanzados en el estudio de opinión respecto a la presencia de brillo en la escritura, fue que no existe diferencia entre los pares de fotografías presentadas antes y después del tratamiento de conservación. La valoración obtenida para este parámetro fue del 83% que establece que ninguna fotografía presenta brillo.
- Los resultados obtenidos por la encuesta en la evaluación de presencia de sustancias extrañas y/o manchas, fue que existe poca diferencia en las fotografías tomadas antes y después de aplicar el fijador en un proceso de conservación acuoso, por consiguiente, las instantáneas con mayor presencia de sustancias extrañas y/o manchas fueron las tomadas antes del proceso, con una apreciación promedio del 77% para las fotografías con

mayor presencia de sustancias extrañas sobre el soporte, lo que sugiere que las fotografías después de la aplicación del fijador no presentaron escarcha y las manchas se reducen al pasar por el tratamiento de lavado.

- De conformidad a los parámetros valorados, se concluye que el producto elaborado no afecta las características visuales del documento de acuerdo con el criterio de los expertos en conservación encuestados.

Referencias

- [1] C. C. y V. Viñas, «Las Tintas, Elementos gráficos del documento,» de La preservación y restauración de documentos y libros en papel: un estudio del RAMP con directrices., París, UNESCO, 1984, p. 15.
- [2] J. V. Peris, Conservación y Restauración de material cultural en Archivos y Bibliotecas, Valencia-España: Pentagraf Impresores, S.L., 2002, p. 29.
- [3] G. H. y A. A. Hopkins, «Tintas, Papeles, Lápices, Lacres etc.,» de El recetario industrial, Barcelona, Gustavo Gili, SL, 1994, p. 1179.
- [4] O. C. y M. Lazzari, «Photo-oxidative stability of paraloid acrylic protective polymers,» ELSEVIER, pp. 17-21, 2000.
- [5] A. C. Rodríguez, «Barnices sintéticos : estudio comparativo de barnices sintéticos utilizados en la restauración de ceramias,» vol. 6, nº 29-46, 2002.
- [6] «UNESCO,» 19 Noviembre 2004. [En línea]. Available: http://www.unesco.org/culture/natlaws/media/pdf/ecuador/ec_codificacion_27_ley_de_patrimonio_cultural_spaorof.pdf. [Último acceso: 7 Julio 2015].
- [7] A. E. Q. Valle, «Utilización de residuos de cáscara de naranja para la preparación de un desengrasante doméstico e industrial,» Quito, 2009.
- [8] F. Kiekeben, «nontoxicprint,» 2015. [En línea]. Available: <http://www.nontoxicprint.com/safesolvents.htm>. [Último acceso: 3 Julio 2015].
- [9] V. y C. P. Bernal, «Extracción del aceite esencial de la cáscara de naranja: caracterización y estudio de potencial industria en el Ecuador,» Quito, 2012.
- [10] P. M. & S. E. Moys, «Aspectos gerais do poliestireno,» vol. 16, 2002.
- [11] R. & R. H. Navarro, «Plastificantes de todo tipo.» vol. 103(664), nº 14-19, 2012.
- [12] S. P. Prades, «Universidad Politécnica de Valencia,» 15 Enero 2009. [En línea]. Available: https://www.upo.es/moleqila/export/sites/moleqila/documentos/Numero18/Peirx_Pradesx_Sara_-_Molequla_xPilarx.pdf.

Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de microalgas usando cepas ATCC

JENNIFER SUASNAVAS^{1,*}, RONNY FLORES¹, INÉS ECHEVERRÍA¹

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito

*Correspondencia: jennilu_12@hotmail.com

Recibido: 8 septiembre 2017. Aceptado: 15 noviembre 2017

Resumen

La presencia de bacterias multirresistentes es un problema de salud pública a nivel mundial, lo que genera la necesidad de buscar alternativas terapéuticas de preferencia de origen natural. El objetivo del trabajo de investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos, metanólicos y hexánicos de los géneros de microalgas: *Chlorella* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp., recolectadas de la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado. Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica de extracción Soxhlet. La actividad antibacteriana se evaluó en primera instancia con el método de dilución en agar, con el que se identificó que de los 12 extractos evaluados, los extractos metanólicos de las microalgas *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp. presentaron actividad inhibitoria frente a la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que ningún extracto presentó actividad frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Con los extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp. se desarrolló el método de Kirby Bauer, obteniéndose halos de inhibición de mayor tamaño en el extracto de *Oscillatoria* sp. Al comparar la actividad de los extractos de las microalgas con los antibióticos de amplio espectro trimetoprima sulfametoxazol y ciprofloxacina, se concluye que estos productos farmacéuticos provocan mayor sensibilidad. A través de un tamizaje fitoquímico se identificaron terpenoides, fenoles y alcaloides los cuales podrían ser responsables de la actividad antibacteriana.

Palabras clave: Extractos de microalgas, método de Kirby Bauer, halos de inhibición, actividad antibacteriana.

Evaluation of the antibacterial activity of microalgae extracts using ATCC strains

Abstract

The presence of multiresistant bacteria is a public health problem worldwide which generates the need to search therapeutic alternatives of natural origin. The objective of this research was to evaluate the antibacterial activity of ethanolic, methanolic and hexane extracts of microalgae gender: *Chlorella* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp. and *Stichococcus* sp., collected at the Ecuadorian Antarctic Station Pedro Vicente Maldonado. The extracts were obtained by the Soxhlet extraction technique. The antibacterial activity was first evaluated with the agar dilution method, and it was identified that from the 12 extracts evaluated, the methanolic extracts of the microalgae *Oscillatoria* sp. and *Stichococcus* sp. presented inhibitory activity against the bacterial strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, whereas no extract presented activity against *Escherichia coli* ATCC 25922. With the methanolic extracts of *Oscillatoria* sp. and *Stichococcus* sp. the Kirby Bauer method was developed, obtaining zones of inhibition that shows greater antibacterial activity by the *Oscillatoria* sp. extract. When comparing the activity of the microalgae extracts with the broad spectrum antibiotics trimethoprim sulfamethoxazole and ciprofloxacin, the conclusion is that these pharmaceutical products cause greater sensitivity. Through phytochemical screening terpenoids, phenols and alkaloids were identified which could be responsible for antibacterial activity.

Keywords: microalgae's extracts, Kirby Bauer method, zones of inhibition, antibacterial activity.

1. Introducción

En los últimos años se ha evidenciado incremento de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial, convirtiéndose en un problema de salud pública, ya que los microorganismos han generado una mayor cantidad de mecanismos de resistencia a los antibióticos usados de forma ordinaria [1] [2], por lo que se ve la necesidad de encontrar componentes bioactivos de fuentes naturales. Una posibilidad son las microalgas, en este caso a partir de los 4 géneros: *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Stichococcus sp.* y *Chlorella sp.*, recolectadas de la estación antártica ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado. Los respectivos extractos se obtienen mediante la técnica Soxhlet mientras que para evaluar la actividad antibacteriana se usa en primer lugar la técnica de dilución en agar que permite evaluar cualitativamente y de forma sencilla un número moderado de condiciones (tipos de extracto frente a cepas bacterianas). Luego, con los extractos en los que se identificó una actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano, se desarrolló la técnica de Kirby Bauer, semicuantitativa que permite evidenciar el tamaño de los halos de inhibición para establecer cuál de los extractos genera una mayor actividad relativa y compararlos frente a antibióticos utilizados como control. Finalmente, es necesario realizar un tamizaje fitoquímico para identificar los posibles grupos químicos que generan la actividad antibacteriana.

Existe una elevada cantidad de estudios relacionados con la evaluación de la actividad antibacteriana a partir de sustancias bioactivas obtenidas de extractos de diversos tipos de microalgas, lo que se consigue por distintos métodos y así mismo realizando diversos ensayos de sensibilidad. El género de microalga *Chlorella sp.* es uno de los más estudiados, dentro de sus componentes están ácidos grasos y chlorellin, se ha aducido que alguno de estos compuestos genera actividad antibacteriana tanto sobre bacterias Gram positivas como Gram negativas. [3]

En otro estudio se usó cianobacterias incluyendo el género de *Anabaena sp.*, que se caracterizó por ser una fuente rica en proteínas y de una gran variedad de productos químicos y farmacéuticos, evidenciando que las cepas Gram negativas fueron más resistentes a los extractos con respecto a los Gram positivas [4], sin embargo, en otro estudio se menciona que se generó mayor inhibición en cepas de bacterias Gram negativas, lo que sería dependiente de las microalgas y solventes usados en la extracción. [5]

En Ecuador también se han realizado investigaciones relacionadas con actividad antibacteriana usando mi-

croalgas, como es el caso de *Chlorella* con la que se obtuvo extractos que generaron halos de inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, lo que concuerda con uno de los estudios mencionados anteriormente sobre este género de microalga; mientras que en otra investigación donde se evaluó la actividad con los extractos de las algas *Euglena viridis* y *Oscillatoria sp.*, no se obtuvo resultados favorables en *Escherichia coli* ni *Staphylococcus aureus*. [6] [7]

La importancia de este estudio radica en identificar fuentes alternativas de compuestos con actividad antibacteriana. Para ello debe implementarse el cultivo y masificación de las microalgas *Anabaena sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Stichococcus sp.* y *Chlorella sp.*, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos, en el Laboratorio de Química Sostenible de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. La implementación y desarrollo de estas metodologías permitirá el desarrollo de futuras investigaciones y la consolidación de líneas de investigación. Es así que el siguiente paso consiste en aislar los componentes con probable actividad antibacteriana mediante técnicas cromatográficas y con ellos evaluar cuantitativamente la actividad antimicrobiana.

2. Parte experimental

2.1. Cultivo y masificación de microalgas

Los medios de cultivo usados fueron BG11 para las microalgas *Stichococcus sp.* y *Oscillatoria sp.*, BG110 para *Anabaena sp.*, que se diferencia del anterior por su stock 1 que carece de nitrógeno y finalmente M1 para *Chlorella sp.*, los cuales fueron preparados y puede encontrarse su composición en la literatura. [8]

El cultivo de las microalgas se realizó a partir de muestras preservadas en ceparios del Laboratorio de Química Sostenible, las mismas que se sembraron mediante estriación en cajas Petri con cada uno de los medios específicos para cada género de microalga, tal como se mencionó anteriormente y se colocaron bajo una fuente de luz con fotoperíodos de 24 horas luz. A partir de estos cultivos se da un pase a medio líquido de modo que se permita el desarrollo y la masificación de las microalgas, transfiriendo el cultivo cada 10 a 12 días a un frasco de mayor capacidad de volumen. Sin embargo, en cultivos líquidos se manejó un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, además de adaptar una fuente de aireación mediante bombas de pecera. [9] La temperatura de los cultivos fue aproximadamente 20°C, debido a que los géneros de microalgas usados en este estudio, tras

procesos de adaptación lograron desarrollarse adecuadamente a temperatura ambiente.

La biomasa de microalgas se obtuvo mediante la separación del medio de cultivo de la biomasa algal mediante sedimentación de forma natural y de acuerdo al género de microalga en ocasiones con ayuda de centrifugación a bajas revoluciones por minuto (2000 - 2500 rpm) mediante una centrifugadora marca Thermo Fisher Scientific. El género *Chlorella sp.* con respecto al resto de microalgas usadas, corresponde a una estructura celular bastante pequeña al no presentar morfología filamentosa, por lo cual se generó retardo en el proceso de sedimentación optando así por el uso de centrifugación. Siguiendo este proceso se realizaron varios lavados con agua destilada asegurando la eliminación completa del medio de cultivo e inmediatamente se llevó a cabo el proceso de deshidratación mediante incubación a 40° C en una incubadora bacteriológica durante 24 horas aproximadamente. Finalmente, se trituró la biomasa deshidratada en un mortero de porcelana con el fin de obtener un polvo homogéneo, el mismo que se almacenó en tubos de plástico tras pesar la masa obtenida. Se cubrieron los tubos con papel aluminio y se los almacenó en un refrigerador a una temperatura de 4°C hasta su uso [9].

2.2. Extracción Soxhlet de microalgas

Para este proceso se pesa la biomasa algal en una cantidad aproximada de 3 a 4 gramos y se la envuelve en un capuchón de papel filtro, a la par se arma el equipo Soxhlet, tal como se indica en la literatura [10] y se inicia el proceso de extracción repitiéndolo durante aproximadamente 24 horas, obteniendo así extractos con tres solventes de diferente polaridad: etanol 80%, metanol 99,9% y hexano 99,9%. Inmediatamente se recupera el extracto concentrado mediante el rotavapor marca IKA HB 10 [10]. Finalmente, el extracto obtenido se guarda en frascos de vidrio ámbar de modo que se evite cualquier reacción con la luz y se lo almacena a 4°C.

2.3. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de microalgas

La actividad antibacteriana de los extractos obtenidos fue evaluada mediante la técnica de dilución en agar, con la cual se identificó a los extractos que presentan actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Luego se aplicó el método de Kirby Bauer, solamente con aquellos extractos en los que se evidenció actividad antibacteriana, de modo que se obtuvo halos de inhibición que fueron comparados con antibióticos de amplio espec-

tro de uso convencional como ciprofloxacina 5 µg y trimetoprima/sulfametoxazol 25 µg.

En primer lugar se desarrolló el método de dilución en agar para el cual se preparó el medio Mueller Hinton agar marca DIFCO, el mismo que se usa en ambos ensayos de sensibilidad. Una vez fundido tras la esterilización en autoclave marca Lab Tech modelo LAC - 5065SP, se le incorpora cada uno de los extractos de microalgas concentrados en una proporción de 9:1 [11] y se procede a homogenizar totalmente esta mezcla para distribuir en cajas Petri a una temperatura de 45°C aproximadamente. Se prepararon inóculos de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a una escala de turbidez 0,5 McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) ajustada mediante método espectrofotométrico. Con los inóculos se obtuvieron diluciones de diferentes concentraciones, desde 1×10^7 hasta llegar a 1×10^4 células/mL. Un volumen de 2 µl de cada dilución fue depositado en la superficie del agar. Las placas Petri se incubaron de 16 a 20 horas a 37°C para evidenciar la inhibición o no de los microorganismos ante la presencia de los componentes bioactivos de las microalgas [11]. Se usó como control positivo de crecimiento, el desarrollo de las dos cepas ATCC en agar Mueller Hinton sin adicionar ningún extracto ni solvente, pudiendo observar el crecimiento de cada una de las cepas en sus distintas concentraciones desde 10^7 hasta 10^4 UFC/mL; mientras que como controles negativos se usaron cada uno de los solventes usados en la extracción, los que se adicionaron en una proporción 9:1 al igual que los extractos (ver figura 1). [11]. Además en aquellos extractos que presentaron actividad antibacteriana al estar concentrados, se determinó la última dilución hasta la que el extracto genera la sensibilidad (MIC).

Una vez obtenidos los resultados en la técnica anterior se aplica el método de Kirby Bauer, para lo cual se preparó el agar Mueller Hinton. Paralelamente se preparan los discos de papel filtro (Whatman # 42), de 6 mm de diámetro, en los que se colocó uniformemente cada uno de los extractos en un volumen de 20 µL, haciendo uso de micropipetas. Las cepas ATCC a utilizarse son cultivos de 24 horas. Una vez listos todos los materiales se ajustó el inóculo de cada cepa a una turbidez 0,5 McFarland [11], con el que se realizó el hisopado por toda la placa de agar y finalmente se colocó sobre el agar hisopado los discos impregnados con el extracto y se espera de 10 a 15 minutos para que se adhieran totalmente. Tras una incubación de 18 a 24 horas, de existir actividad antibacteriana por parte de los extractos, se observan halos de inhibición alrededor de los discos, en los cuales se midió su diámetro en milímetros [11] [12].

Se usaron como controles negativos a discos de papel filtro sin ningún aditivo y discos impregnados con los solventes: hexano 99,9%; etanol 80% y metanol 99,9%, mientras que como controles positivos se usaron a dos antibióticos de amplio espectro: trimetoprima/sulfametoxazol de 25 µg y ciprofloxacina de 5 µg.

2.4. Tamizaje fitoquímico

Este análisis fitoquímico se basó en pruebas preliminares para la identificación cualitativa de compuestos químicos en los extractos que presentaron actividad antibacteriana, tal como alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, antraquinonas, terpenoides, saponinas y azúcares reductores.

La identificación de alcaloides se la desarrolló mediante reacción de Mayer y Wagner; fenoles totales y taninos mediante reacción con cloruro férrico; flavonoides con la denominada prueba con H_2SO_4 , antraquinonas con prueba de Borntrager; terpenoides con prueba de Liebermann- Burchard y prueba de Salkowski; saponinas mediante ensayo de la espuma y azúcares reductores mediante reacción de Fehling. [13] [14]

2.5. Análisis estadístico

Los halos de inhibición obtenidos mediante la técnica de Kirby Bauer fueron sometidos a un análisis de varianza de dos factores (ANOVA), donde el factor a es el tipo de extracto y el factor b es la dilución del extracto, cada uno con sus respectivos niveles. Luego se aplica un análisis de Tukey para establecer la presencia de diferencia estadísticamente significativa entre todas las medias comparadas. Finalmente, se aplicó análisis t de Student para comparar los tamaños de los halos de inhibición de los extractos concentrados respecto a los controles positivos: ciprofloxacina 5 µg (CIP) y trimetoprima/ sulfametoxazol 25 µg (SXT).

Todo el análisis fue realizado con un nivel de confianza del 95%, en el programa estadístico GraphPad PRISM® Ver. 6.01.

3. Resultados y Discusión

3.1. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de microalgas

En primer lugar se detallan los resultados obtenidos mediante la técnica de dilución en agar. Esta metodología permite determinar la sensibilidad o resistencia de un microorganismo frente a distintos antibióticos y a varias concentraciones del mismo, por tanto esta técnica permitió determinar que 2 de los 12 extractos presentaron actividad antibacteriana y ambos fueron extractos metanólicos de las microalgas *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp. Ambos extractos presentaron actividad frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que ningún extracto generó actividad frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Es posible que la complejidad de la pared celular (delgada capa de peptidoglucano y cantidades considerables de ácidos teicoico y teicurónico) [15] que presentan las bacterias Gram negativas proteja a las células del acceso de los componentes presentes en el extracto. Sin embargo, se debería ampliar el estudio a un mayor número de especies Gram positivas y Gram negativas para poder profundizar en esta hipótesis.

El ensayo con los controles negativos (solventes) permitió evidenciar que los solventes no son los responsables de la inhibición generada, pudiendo así asociar dicha actividad a los componentes bioactivos extraídos. El desarrollo de las dos cepas ATCC en agar Mueller Hinton, se usó como control positivo de crecimiento donde se observó el crecimiento de cada una de las cepas en sus distintas concentraciones desde 10^7 hasta 10^4 UFC/mL (ver figura 1). [11]

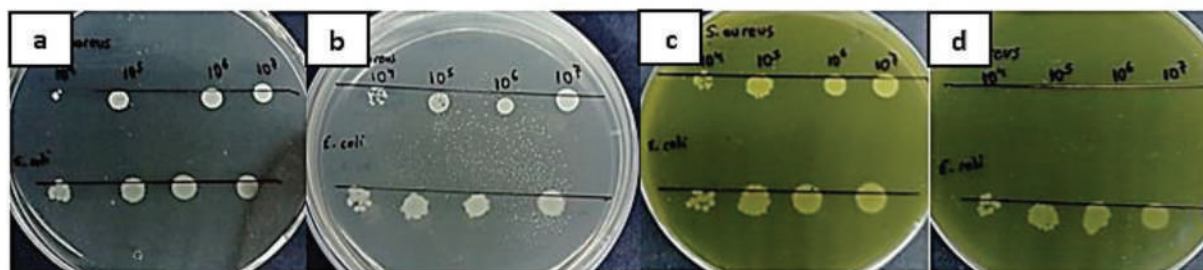


Figura 1. Técnica de dilución en agar. Porción superior de la placa *Staphylococcus aureus* e inferior *Escherichia coli* a) control positivo: desarrollo en agar Mueller Hinton, b) control negativo: adición de solvente al medio, c) extracto no genera inhibición y d) extracto genera inhibición.

En aquellos extractos que presentaron actividad antibacteriana al estar concentrados frente la cepa *Staphylococcus aureus*, se determinó la última dilución hasta la que el extracto genera la actividad

(CMI), resultados que se muestran en la tabla 1 y 2 para el extracto metanólico de *Oscillatoria* sp. (MO) y extracto metanólico de *Stichococcus* sp. (MS), respectivamente.

Tabla 1. Resultados de extracto metanólico de *Oscillatoria* sp. frente a *S. aureus* ATCC 25923

MO	Respuesta de <i>S. aureus</i>			
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ (UFC/mL)
Extracto concentrado	+	+	+	+
Dilución 1:2	+	+	+	+
Dilución 1:4	+	+	+	+
Dilución 1:8	+	+	+	+
Dilución 1:16	+	+	+	+
Dilución 1:32	+	+	+	+
Dilución 1:64	-	-	-	-

MO: extracto metanólico de *Oscillatoria* sp. Resultados: (+) inhibición y (-) no inhibición

Tabla 2. Resultados de extracto metanólico de *Stichococcus* sp. frente a *S. aureus* ATCC 25923

MS	Respuesta de <i>S. aureus</i>			
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷ (UFC/mL)
Extracto concentrado	+	+	+	+
Dilución 1:2	+	+	+	+
Dilución 1:4	+	+	+	+
Dilución 1:8	+	+	+	+
Dilución 1:16	+	+	+	+
Dilución 1:32	-	-	-	-
Dilución 1:64	-	-	-	-

MS: extracto metanólico de *Stichococcus* sp.; Resultados: (+) inhibición y (-) no inhibición

A partir de los resultados de ambos extractos mediante la técnica de dilución en agar, se observó que la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* fue más sensible el extracto metanólico de *Oscillatoria* sp. con respecto al extracto metanólico de *Stichococcus* sp. El primer extracto inhibe al microorganismo hasta con una dilución 1:32, mientras que el segundo solamente logra inhibir hasta con una

dilución de 1:16, y a todas las concentraciones del inóculo bacteriano.

Luego se aplicó la técnica de Kirby Bauer haciendo uso de aquellos extractos que presentaron actividad antibacteriana, es decir con extracto metanólico de *Oscillatoria* sp. (MO) y extracto metanólico de *Stichococcus* sp. (MS). Método que se llevó a cabo con

el fin de determinar el tamaño del halo de inhibición (mm) por parte de ambos extractos concentrados (E) y realizando diluciones 1:2 y 1:4 de cada uno de ellos, resultados que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Halos de inhibición generados por los extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

		Diámetro del halo de inhibición en mm					
		Tipo de extracto					
		MO			MS		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
Dilución de extracto	E	17.76	17.01	17.83	14.21	13.69	14.01
	1:2	15.94	16.13	15.87	11.28	12.90	13.20
	1:4	13.12	13.36	13.65	7.76	7.64	8.01

MO: extracto metanólico de *Oscillatoria* sp. y **MS:** extracto metanólico de *Stichococcus* sp. **E:** extracto concentrado, **1:2:** dilución 1:2 y **1:4:** dilución 1:4; R: número de repetición

Los diámetros de zonas de inhibición fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA de dos factores, donde se determinó que tanto el tipo de extracto (MO y MS) como la dilución del extracto (E, 1:2, 1:4) generan un efecto significativo sobre el tamaño de los halos de inhibición, es así que *Staphylococcus aureus* resultó más sensible frente al MO. (ver figura 2). Así también mediante un análisis de Tukey se pudo establecer

que existe una diferencia estadísticamente significativa entre todas las medias comparadas, a excepción de los tratamientos E-MS vs 1:3-MO y 1:3-MO vs. 1:2-MS, en los cuales no se encuentra una diferencia significativa entre las medias concluyendo que estas son estadísticamente iguales, lo que fue reportado con un nivel de confianza del 95%, análisis realizado en el programa estadístico GraphPad PRISM®.

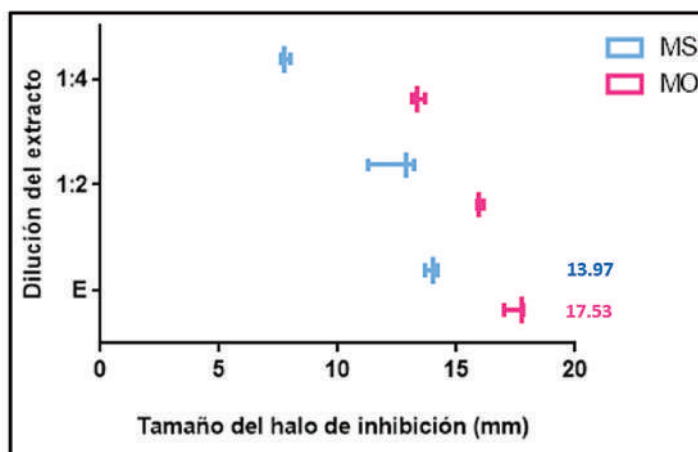


Figura 2. Diagrama de cajas para comparación de medias de halos de inhibición de MO vs. MS, donde se representa el valor mínimo, máximo y la media correspondiente a cada dilución, frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **MO:** extracto metanólico de *Oscillatoria* sp., **MS:** extracto metanólico de *Stichococcus* sp., **E:** extracto concentrado, dilución **1:2,** dilución **1:4** de cada extracto.

Fuente: Programa estadístico GraphPad PRISM® Ver. 6.01

Con respecto a los controles positivos que fueron los antibióticos de amplio espectro: ciprofloxacina 5 μg (CIP) y trimetoprima/ sulfametoxazol 25 μg (SXT), se evidenció que los halos obtenidos se encuentran dentro de los rangos que establece el CLSI [16], y así mismo se comprue-

ba que no son los solventes ni alguno de los componentes que posee el papel filtro, los agentes que generan la actividad antibacteriana, ya que no hubo halo de inhibición en estos ensayos. En la figura 3 se muestran imágenes del ensayo realizado mediante el método de Kirby Bauer.

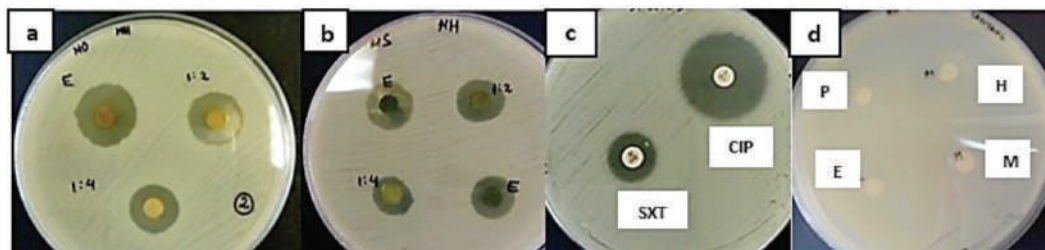


Figura 3. Método de Kirby Bauer. Extracto metanólico concentrado, dilución 1:2 y dilución 1:4. a) *Oscillatoria* sp. b) *Stichococcus* sp.; c) controles positivos: ciprofloxacina 5 μg (CIP= 30 mm) y trimetoprima/ sulfametoxazol 25 μg (SXT= 24 mm) d) controles negativos: P= papel filtro, H= hexano, E= etanol y M= metanol

Mediante análisis t de Student se demuestra diferencia significativa en todos los casos al ser comparados los extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp. con respecto a los controles positivos: ciprofloxacina 5 μg (CIP) y trimetoprima/ sulfametoxazol

25 μg (SXT), tomando en cuenta las tres repeticiones realizadas. Así se concluye que estos últimos generan mayor sensibilidad en la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* con respecto a los extractos. Los resultados del análisis estadístico se muestran en la figura 4.

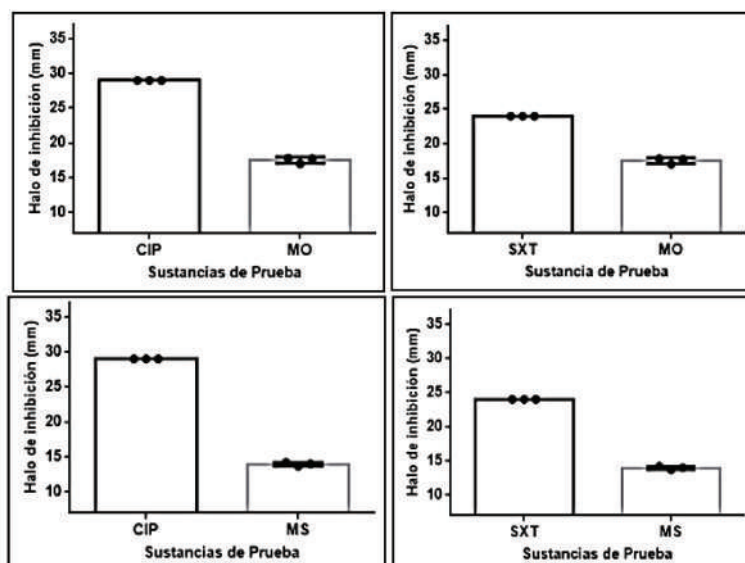


Figura 4. Diagrama de dispersión con barras-comparación de controles positivos (SXT y CIP) contra extractos concentrados (MO y MS) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Donde SXT: trimetoprima/sulfametoxazol 25 μg ; CIP: ciprofloxacina 5 μg , MO: extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp. y MS: extractos metanólicos de *Stichococcus* sp.

Fuente: Programa estadístico GraphPad PRISM® Ver. 6.01

3.2. Tamizaje fitoquímico

Este tamizaje fitoquímico se basó en una serie de pruebas cualitativas para distintos grupos químicos,

mediante reacciones de precipitación y coloración. Se escogió al azar uno de los extractos que no presentó actividad antibacteriana, este fue el extracto metanólico de *Anabaena* sp., el mismo que se usó

como control negativo. Se evidenció que el extracto metanólico de *Anabaena* sp. no posee alcaloides, flavonoides ni terpenoides a diferencia de los extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp., resultados que se muestra en la tabla 4. Se puede inferir que probablemente alguno de estos

compuestos químicos sea el responsable de la actividad antibacteriana, sin embargo, debe tenerse en cuenta que este tamizaje solamente brinda datos preliminares sobre los componentes que conforman los extractos, por lo que deberá confirmarse con análisis cuantitativos.

Tabla 4. Resultados de tamizaje fitoquímico en tres extractos metanólicos de microalgas

Compuesto Químico	Reacción	Extractos			Interpretación positiva
		MO	MS	MA	
Alcaloides	Reacción de Wagner	+	+	-	Precipitación café rojiza
	Reacción de Mayer	+	+	-	Precipitado o coloración amarilla cremosa
Flavonoides	Prueba con H ₂ SO ₄	+	+	-	Coloración naranja
Terpenoides/ Esteroides	Reacción de Liebermann – Burchard	+	+	-	Aro de esteroide color café
	Reacción de Salkowski	+	+	-	Coloración café rojiza en la cara interior
Antroquinonas	Reacción de Borntrager	-	-	-	Coloración rosada
Fenoles	Prueba con FeCl ₃	+	+	+	Color negro azulado
Taninos	Prueba de FeCl ₃	-	-	-	Color verde oscuro
Saponinas	Prueba de espuma	-	-	-	Burbujas de espuma persisten al someter a calentamiento y tiene una altura mayor a 5 cm.
Carbohidratos (Azúcares reductores)	Reacción de Fehling	-	-	-	Precipitado de coloración rojiza.

MS: extracto metanólico de *Stichococcus* sp., **MO:** extracto metanólico de *Oscillatoria* sp., **MA:** extracto metanólico de *Anabaena*

En base a análisis fitoquímicos previos se han descrito componentes con importancia antibacteriana como son los flavonoides, alcaloides, esteroides y saponinas [13] [14], compuestos bioactivos que también se encontraron en los extractos de estudio, a excepción de las saponinas que no fueron identificadas, por lo que se podría inferir que alguno de estos compuestos pueden ser los responsables de la actividad antibacteriana, en concordancia con los estudios ya publicados. Para confirmarlo, se requiere estudios adicionales que permitan aislar o sintetizar los potenciales principios activos y evaluar cuantitativamente su actividad antimicrobiana (MIC concentración mínima inhibitoria, NIC concentración no inhibitoria, e IC50 concentración inhibitoria del 50% de la población).

4. Conclusiones

La técnica de dilución en agar permitió identificar que a partir de 12 extractos, 4 etanólicos, 4 metanólicos y 4

hexánicos, fueron solamente los extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp. y *Stichococcus* sp. los que presentaron actividad antibacteriana y lograron inhibir a la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 no fue inhibida por ningún extracto, además de ello se evidencia una mayor sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente al extracto de *Oscillatoria* sp., demostrada tanto en la técnica de dilución en agar como por el método de difusión en disco y estadísticamente. Además se nota que el tamaño de los halos de inhibición son dependientes de la dilución del extracto.

Se demostró diferencia significativa entre los halos de inhibición generados por los extractos con respecto a antibióticos de amplio espectro de uso convencional, concluyendo que estos antibióticos generan mayor sensibilidad que los extractos de las microalgas. En el tamizaje fitoquímico se identificaron los siguientes compuestos bioactivos: fenoles como los flavonoides,

terpenoides, esteroides y alcaloides, los mismos que están presentes tanto en el extracto de la microalga *Oscillatoria* sp. como *Stichococcus* sp., por lo que se cree que alguno de ellos o en conjunto podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana generada, ya que en estudios similares realizados previamente por Kavitha et al. y Rajendran et al. se identificaron los mismos componentes en extractos de diversas microalgas, donde usaron varios solventes. [13] [14]

Se encontraron discrepancias con respecto a estudios similares, enfocadas específicamente a la actividad antibacteriana, es así el caso de un estudio mencionado en la sección 1, el cual fue publicado en el año 2014 por Campoverde y Pomaquiza, quienes usaron extractos metanólicos de *Oscillatoria* sp., al igual que en el presente estudio. [6] A pesar de ello, no evidenciaron inhibición de ninguno de los microorganismos ensayados, lo cual puede asociarse al origen de las

microalgas usadas, pudiendo inferir que las microalgas antárticas del presente estudio tienen ventaja sobre las otras. Al ser microalgas psicrófilas, presentan una alta capacidad de adaptación, por lo cual son capaces de desarrollar mecanismos que les permiten sobrevivir a condiciones extremas y por todo ello son atractivas para una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas. [17]

El siguiente paso en esta investigación consistirá en aislar los componentes con probable actividad antibacteriana mediante técnicas cromatográficas y con ellos evaluar cuantitativamente la actividad antimicrobiana, de modo que se pueda determinar MIC, NIC e IC50.

5. Agradecimientos

Al Instituto Antártico Ecuatoriano, por facilitar la investigación con microalgas antárticas recogidas en la estación Predro Vicente Maldonado.

Bibliografía

- [1] Malbrán, C. G. (2015). Resistencia a los antimicrobianos: causas, consecuencias y perspectivas en Argentina. Argentina: Dpto. Bacteriología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Recuperado de: http://186.33.221.24/medicamentos/files/Resistencia_antimicrobiana_en_Argentina.pdf
- [2] OMS. (2016). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado el 18 de Marzo de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- [3] Amaro, H. M., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2011). Antimicrobial activities of microalgae : an invited review. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2(3), 1272–1280.
- [4] Rosales-Loaiza, N., Hassanhi, M., & Morales, E. (2012). Actividad Biológica de extractos de dos cepas de la Cianobacteria NOSTOC. *Centro de Investigaciones Biológicas*, 46(1), 45–62
- [5] Pérez, M. J., Falqué, E., & Domínguez, H. (2016). Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Revista Marine Drugs*, 14(52), 1–38.
- [6] Campoverde-Alvarado, M. V., & Pomaquiza-Lema, G. V. (2014). Determinación de la Actividad Antibacteriana de *Euglena viridis* y *Oscillatoria* sp. sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Universidad de Cuenca.

- [7] Barona-Altamirano, A. C. (2014). Determinación del Potencial Antimicrobiano de la Microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las acequias de Atocha, Titulum y El Socavón del Cantón Ambato. Universidad Técnica de Ambato.
- [8] Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Boca Ratón, USA: Taylor & Francis Group.
- [9] MALGAS. (2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica* (1 ed.). Asturias: AST Ingeniería S.L.
- [10] Núñez, C. E. (2008). Extracciones con Equipo Soxhlet. Recuperado el 19 de Septiembre de 2016, de cenunez.com.ar.
- [11] CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition* (9 ed., Vol. 32). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [12] Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2015). Chapter 25: Disk Diffusion Assay to Assess the Antimicrobial Activity of Marine Algal Extracts. In *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1308, pp. 403–410). Obtenido de: <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8>
- [13] Rajendran, N., Karpanai Selvan, B., Sobana Piriya, P., Logeswari, V., Kathiresan, E., Tamilselvi, A., & John Vennison, S. (2014). Phytochemicals, antimicrobial and antioxidant screening from five different marine microalgae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 7(2), 78–85. Obtenido de: [http://jchps.com/specialissues/Special issue2/jchps si2 13 Nishanthi rajendran das 78-85.pdf](http://jchps.com/specialissues/Special%20issue2/jchps%20si2%2013%20Nishanthi%20rajendran%20das%2078-85.pdf)
- [14] Kavitha, J., & Palani, S. (2016). Phytochemical screening, GC-MS analysis and antioxidant activity of marine algae *Chlorococcum humicola*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(6), 1154–1167. Obtenido de: <http://doi.org/10.20959/wjpps20166-6871>
- [15] Morse, S. A., & Carroll, K. C. (2010). *Microbiología médica*. México: McGrawHill.
- [16] CLSI. (2017). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. (27 ed.). USA: 1-282
- [17] Lyon, B. & Mock, T. (2014). Polar Microalgae: New Approaches towards Understanding Adaptations to an Extreme and Changing Environment. *Biology*, 3(1), 56-80.

Instrucciones para los autores

La revista **QUÍMICA CENTRAL** publica artículos originales en todos los campos de la química que contengan resultados de investigaciones experimentales, teóricas o aplicadas, que no hayan sido publicados anteriormente ni que estén bajo consideración en otras revistas.

Recepción de manuscritos

Los manuscritos se recibirán solamente por vía electrónica, en formato de Microsoft Office Word u Open Office Writer para Windows, al correo del Consejo Editorial (revista.fcq@uce.edu.ec) con un máximo de 5 MB por archivo. Los manuscritos para ser evaluados no deben haber sido anteriormente publicados en ningún medio físico o electrónico. El manuscrito debe ir acompañado de una carta o un texto de correo electrónico solicitando al Consejo Editorial su publicación e indicando que el mismo no ha sido publicado previamente, ni está siendo evaluado para su publicación en otra revista y que todos los autores que aparecen en el manuscrito conocen y aceptan el contenido del mismo.

Revisión y publicación

Cada manuscrito recibido será sometido a un proceso de revisión por pares de doble ciego, tanto el revisor como el autor son anónimos. La decisión sobre la publicación del manuscrito se notificará por correo electrónico a la persona de contacto junto con el informe de los revisores. De aprobarse el artículo, luego de las correcciones, será publicado en físico y digital en el siguiente número de la revista.

Formato del manuscrito

El manuscrito debe ser redactado en tamaño de papel A4 (21x29.7 cm), márgenes derecho, izquierdo, superior e inferior de 2.0 cm. Todo el texto debe estar escrito a doble espacio y alineado a la izquierda. El tamaño de letra debe ser 12 Times, estilo de fuente normal, usar cursiva para los nombres en latín de organismos vivos. No sangrar la primera línea de cada párrafo luego de punto aparte o de un título. No van espacios en blanco entre los párrafos. Deberá emplearse el Sistema Internacional de Unidades (SI), tanto en el texto, cuanto en las figuras y tablas. No utilizar división automática de palabras para separar sílabas. En lo posible no emplear notas al pie de página. Los subtítulos van numerados en negrita Times 12, alineados a la izquierda. Después del número va punto y espacio, la primera letra con mayúscula. El límite del manuscrito

es de 5000 palabras.

Organización del manuscrito

Las secciones del manuscrito son:

- Título
- Nombre(s) del autor(es) y afiliación(es)
- Resumen y palabras claves
- Title
- Abstract y key words
- 1. Introducción
- 2. Parte experimental.
- 3. Resultados y Discusión
- 4. Conclusiones
- Agradecimientos (opcional)
- Referencias

Título

El título debe ser claro, conciso y escogido cuidadosamente para reflejar el contenido del trabajo reportado. No utilizar abreviaturas, máximo 10-12 palabras.

Nombre(s) del autor(es) y afiliación(es)

Para listar los autores del trabajo, poner el primer nombre y el/los apellido(s) de todos los investigadores que han hecho una sustancial contribución al trabajo. El nombre del autor principal irá en primer lugar y al final el nombre del tutor, jefe de laboratorio o director de proyecto. Deben omitirse todos los títulos, ocupaciones y grados académicos como: Prof., Coord., Dr., Lcdo., MSc, PhD. Después de los autores poner la afiliación (nombre y dirección de la institución) de cada uno y con letras superíndices relacionar la afiliación con los autores. Señalar el contacto o a quien va dirigida la correspondencia con un asterisco (*) sobre el apellido y agregar el correo electrónico. Si el autor a quien va dirigida la correspondencia ya no está en la institución donde el trabajo fue realizado, colocar la dirección actual como una nota al pie de página marcada con un asterisco (*).

Resumen

Todos los manuscritos deben tener un resumen del trabajo realizado. Contiene una clara indicación del objetivo, los resultados más importantes y las conclusiones para que los lectores puedan determinar si el texto completo será de su interés. Debe estructurarse en un sólo párrafo, no debe exceder las 200 palabras y no debe incluir ecuaciones ni referencias.

Palabras Claves: Colocar de tres a cinco palabras claves.

Title y Abstract

Poner el título del manuscrito en inglés.

A continuación colocar la palabra "Abstract." y escribir el contenido del resumen en inglés. Después, escribir "Key words:" y poner las palabras claves en inglés. No utilizar un traductor automático como traductor de Google.

Introducción

En la introducción debe indicarse claramente el propósito y los objetivos de la investigación. No debe incluirse una revisión extensa de trabajos previos, solamente una revisión bibliográfica relevante. La introducción no debe extenderse más de dos páginas a doble espacio.

Parte Experimental

El reporte del trabajo experimental debe incluirse en la sección experimental. Esta sección debe presentar una descripción clara y sin ambigüedades de los materiales, métodos y equipos utilizados con suficiente detalle que permita la reproducción del trabajo por otros investigadores. Debe evitarse descripciones repetitivas de un procedimiento general. La sección debe estar dividida en subsecciones. Debe indicarse explícitamente las precauciones de manejo de material peligroso o de procedimientos peligrosos y, en caso de uso de animales, la aprobación correspondiente por el comité ético local.

Resultados y discusión

La función de esta sección es presentar objetivamente los principales resultados y su interpretación en una secuencia lógica. No debe incluirse detalles experimentales y debe redactarse en tiempo pasado. Se recomienda utilizar material ilustrado como tablas y figuras para mostrar los resultados. No debe presentarse el mismo resultado en tablas y en figuras. Debe indicarse el procedimiento estadístico empleado para analizar los resultados y reportar el nivel de significancia utilizado. Debe relacionarse los resultados del artículo con lo encontrado en otros estudios similares.

Conclusiones

Esta sección resume brevemente las principales conclusiones del trabajo y no debe ser un duplicado de la información del resumen (abstract) ni repetir puntos de la discusión. La conclusión debe estar basada en la evidencia presentada.

Agradecimientos (opcional)

Esta sección puede usarse para agradecer discusiones

de otros investigadores o asistencia técnica de personas que no son coautores del trabajo. También, puede agradecerse la asistencia económica o donación de reactivos.

Referencias

En el texto del manuscrito, la referencia se cita usando el formato (Apellido, año) o Apellido (año), según corresponda. No deberá incluirse en la referencia material bibliográfico que no haya sido señalado explícitamente en el texto. Los nombres de revistas deben ir completos y no abreviados. Para el formato de las referencias utilizar el Administrador Automático de Fuentes de Microsoft Office Word, versión 2007 o superior. En el administrador de fuentes seleccionar el estilo APA (American Psychological Association) y llenar todos los campos disponibles. Las referencias van en orden alfabético.

Ecuaciones

Las ecuaciones deben estar enumeradas consecutivamente, con el número entre paréntesis (1) y alineado a la derecha.

Estructuras Químicas

Las estructuras químicas deben dibujarse usando cualquier programa para el efecto como: ChemDraw, ISIS/Draw, ChemSketch u otros. Deben utilizarse los parámetros establecidos para publicaciones ACS.

Caracterización de compuestos

Para todos los compuestos nuevos, debe proveerse evidencia que permita establecer su identidad y grado de pureza. La evidencia de la identidad de compuestos nuevos debe incluir espectros de $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, HRMS o datos de análisis elemental. Para compuestos sintetizados y que han sido previamente reportados en la literatura, debe citarse el método de preparación y los datos de la bibliografía usados para confirmar la identidad del compuesto y debe indicarse las técnicas empleadas para determinar su pureza.

Figuras, esquemas y tablas

Todas las figuras, esquemas y tablas deben mencionarse en el texto en orden consecutivo y numeradas independientemente con números arábigos. Los títulos van en negrita y con mayúscula la primera letra, después del número va punto (**Tabla 1**). Luego, sin negrita, la descripción de la figura, esquema o tabla. Las descripciones deben ir justificadas, por debajo de las figuras y esquemas y por encima de las tablas. Los títulos y descripciones deben ser auto comprensibles, es decir,

que expliquen adecuadamente lo que representan. Las figuras, esquemas y tablas se intercalarán en el texto después de su primera mención. Las figuras pueden ser gráficos realizados en Microsoft Office Word, Excel o similares o fotografías en blanco y negro o a color digitalizadas en alta resolución (300 dpi). Los esquemas son las secuencias de una reacción y se realizarán usando cualquier programa para dibujar estructuras químicas (ver Estructuras Químicas). Las Tablas estarán en formato de Word o similar y no insertadas como imagen. Para las Tablas utilizar sólo bordes horizontales (superior, inferior y títulos). Diseñar las tablas, esquemas y figuras para que se ajusten al ancho de una (aprox. 8 cm) o dos (aprox. 17 cm) columnas de la revista y comprobar que las leyendas sean legibles.

Bibliografía Recomendada:

- Anderson, G. (2004). How to write a paper in scientific journal style and format. Recuperado el 15 de enero de 2010, de sitio Web de Bates College: <http://abacus.bates.edu/~ganderso/biology/resources/writing/HTWtoc.html>
- Coghill, A. M., & Garson, L. R. (Edits.). (2006). *The ACS Style Guide: Effective Communication of Scientific Information* (Third ed.). New York: Oxford University Press.
- Day, R. A. (2005). *Cómo escribir y publicar trabajos científicos* (Tercera ed., Vol. 598). (M. Sáenz, Trad.) Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud.

DIRECTOR

Quím. Ronny Flores, MSc, PhD

Investigador Docente Laboratorio de Química Sostenible
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Consejo Editorial

Dr. Wilson Parra, MSc

Laboratorio de Química de Coordinación y del Estado Sólido
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Dr. Trosky Yanez, MSc

Laboratorio de Química Orgánica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Dr. Ivan Tapia, MSc

Laboratorio de Química Analítica Instrumental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Dra. Isabel Fierro Aguas, MSc

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Central del Ecuador

Dr. Jorge Heredia-Moya, PhD

Centro de Investigación Biomédica
Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador

Dra. María José García Celia, PhD

Facultad de Farmacia, Unidad de Tecnología farmacéutica
Universidad de Barcelona, España

Dr. René Miranda Ruvalcaba, PhD

Laboratorio de estudios sobre química verde
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México, México

Consejo Técnico:

MSc. Manuel A. Pinto B.

Analyst of Product Transfer and Development
Tecnandina – Grunenthal, Ecuador

Dr. Julio Cesar Vinuesa Galárraga

Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador

Quím. Pablo Bonilla, MSc, PhD

Docente Investigador Laboratorio de Nanomateriales
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Q.F. Diego Lucero-Borja

Institute of Biomedicine (IBUB) and Department of Chemical Engineering and
Analytical Chemistry
Universitat de Barcelona, España

Dr. Luis Ramos, PhD

Docente Investigador Centro Investigación de Alimentos, CIAL
Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador

Dra. Martha Suárez Heredia, PhD

Docente Investigador Laboratorio de Productos Naturales
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Dra. Liliana Naranjo Balseca

Docente Investigador Laboratorio de Química Farmacéutica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

MSc. Edgar Santiago Ojeda Riascos

Docente Investigador Departamento de Química y Ciencias exactas
Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador

Quím. Flavio Norberto López, MSc

Laboratorio de Fisicoquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Quím. Martha Romero Bastidas, MSc

Investigadora Química
Instituto Nacional de Patrimonio Cultural, Ecuador

MSc. Graciela Virginia Mascareño Quintana

Centro Nacional de Preservación Documental
Biblioteca Nacional de Venezuela, Venezuela

PhD. Ana Poveda Gabaldón

Docente Investigador Centro Internacional de Zoonosis
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Dra. Rommy Terán, MSc.

Docente Investigador Laboratorio de Microbiología
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Quím. Verónica Taco, MSc

Investigador Docente Laboratorio de Química Sostenible y Ambiental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Dra. Mariela Cumandá Balseca Ibarra

Facultad de Odontología
Universidad Central del Ecuador, Ecuador

Bioq. María José Andrade Cuvi, MSc

Centro de Investigación de Alimentos, CIAL
Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias, FCII
Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador



Esta edición que consta de 200 ejemplares en papel couche mate de 115 grs., se terminó de imprimir diciembre de 2017, siendo Rector de la Universidad Central del Ecuador el señor Dr. Fernando Sempértegui Ontaneda, y Directora de Comunicación y Cultura MSc. Ivanova Nieto Naspeth.