

# Vitae

REVISTA DE LA FACULTAD DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA



ISSN 0121-4004 / ISSNe 2145-2660  
Volumen 20 número 1, 2013. pp. 72  
Medellin, Colombia

## FE DE ERRATAS

Quito, 23 de mayo de 2013

Señores,

Revista Vitae

Faculta de Química Farmacéutica

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Es nuestro deseo, por medio de la presente, aclarar un error involuntario en el envío de la información con respecto a los autores del artículo: " Desarrollo de una bebida de *Vaccinium floribundum* Kunth con aplicación de luz ultravioleta como método de pasteurización", para su publicación en el Suplemento del I Congreso Internacional en Investigación e Innovación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (Vol. 19 No. 1 (1) de 2012), páginas S165-S167.

Se desea aclarar que en el mencionado artículo debe constar como coautora la Dra. Lucía Ramírez.

Los abajo firmantes, autores del trabajo, damos testimonio de lo anteriormente expuesto.

Atentamente

  
Ing. Angélica Alcívar

  
Ing. Andrea Borja

  
Ph.D. Lucía Ramírez

  
Ph.D. Stalin Santacruz

## EDITORIAL

# PROPUESTA DE REFORMA AL SISTEMA DE SALUD EN COLOMBIA ¿POR QUÉ NO SE AVANZA EN UNA REFORMA ESTRUCTURAL?

## PROPOSED HEALTH SYSTEM REFORM IN COLOMBIA ¿WHY THERE IS NO ADVANCE IN A STRUCTURAL REFORM?

Los académicos de la salud pública del país coinciden en que el proyecto de reforma del Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS), puesto a consideración del Congreso de la República por parte del Gobierno Nacional (1), no responde a las expectativas que se tenía después de que el mismo presidente de la República Doctor Juan Manuel Santos aceptara que la magnitud de la crisis del sistema justificaba el emprendimiento de cambios estructurales centrados en la garantía del derecho fundamental a la salud.

Desde que, a partir de finales del año 2009, se hiciera el gran debate nacional que condujo al “Estado de Emergencia Social” (2) y a los restrictivos decretos sobre salud expedidos a su amparo, declarados inexecutable por la Corte Constitucional (3), se multiplicó la invocación de estudios que evidencian los fracasos del modelo de mercado de la salud instaurado por la Ley 100 de 1993 (4). El análisis juicioso de esas evidencias fácticas conllevó simultáneamente a la presentación de fundamentos de filosofía política que apuntalaban la propuesta de que el Estado reasumiera plenamente la responsabilidad de garantizar el cuidado de la salud de los colombianos como un derecho fundamental. En este contexto, se ha presentado y difundido sólidos argumentos para soportar la idea de que tal responsabilidad estatal debe pasar por la eliminación de la intermediación privada en el modelo de aseguramiento y de prestación de servicios de salud, lo que en consecuencia implica la eliminación de las Entidades Promotoras de Salud (EPS) incorporadas en la normatividad institucional definida por la mencionada ley de 1993. El común de esos argumentos se refiere a lo dañina que esa intermediación ha resultado para el acceso oportuno a los servicios.

Sin embargo, en el proyecto presentado por el gobierno se mantiene abiertos los mecanismos para la participación del sector privado en la intermediación de la prestación de los servicios de salud, truncándose las esenciales expectativas que el país se había hecho con respecto a la reforma estructural nuestro sistema de salud.

Si a esta expectativa no cumplida se le agrega la ausencia de liderazgo del Ministerio de Salud y Protección Social para llevar adelante y categóricamente los contenidos de la Atención Primaria en Salud, de las Redes Integradas de Servicios de Salud y del Plan Decenal de Salud Pública según los términos aprobados en la Ley 1438 de 2011 (5), reconocidos como avances significativos en dirección a rescatar los conceptos y estrategias bien probadas por las experiencias de la salud pública en el mundo, hay que decir que el proyecto de reforma gubernamental representa un significativo retroceso.

A todas estas, la discusión se ha vuelto monótonamente repetitiva y carente de interés. El gobierno se empeña en demostrar, sin éxito, que su desvaído proyecto tiene algún alcance importante para superar los inocultables problemas del sistema de salud; entre tanto, los académicos volvemos a insistir en la argumentación aconsejada por la experiencia en el sector, por los conocimientos decantados por la investigación y por el análisis juicioso de la realidad sanitaria del país para reiterar la necesidad de una reforma estructural. En esencia se trata de un contraste de conceptos que no podrán dirimirse en tanto sea puesto en el escenario del debate con la plena significación de que lo que subyace es una contraposición de fundamentos políticos e ideológicos, relacionados con la concepción que se tiene del Estado, de sus responsabilidades y de los derechos de las personas.

Desde esta perspectiva, lo que vale la pena en las actuales circunstancias es preguntarse por las razones que impiden que se avance consistentemente hacia una reforma estructural del sistema de salud. Tal vez allí residan las grandes posibilidades para que la academia contribuya con su ejercicio intelectual a la incorporación de cambios institucionales que le aporten salidas consistentes a los problemas de salud y bienestar a la sociedad colombiana. Posiblemente el develamiento de los impedimentos conceptuales que dificultan que el Estado y los dirigentes políticos comprometan sus decisiones con instrumentos idóneos para la garantía del cuidado de la salud como derecho fundamental, sea uno de los grandes temas a afrontar.

Por lo anterior, se sugiere que la academia discurra con mayor énfasis por los caminos de la filosofía del Estado, del significado de lo público, de los derechos de las personas en función de tal condición y de los fundamentos esenciales de la salud pública; a que convoque a los ciudadanos para que interroguen al gobierno y a los partidos políticos acerca de cuáles son los fundamentos relativos a esos temas que inspiran su accionar y su intención de obtener legitimidad ciudadana para conducir el gobierno del país y las políticas sociales, entre las que se destacan, como una de las más significativas, las de la salud y el bienestar; asimismo, que muestre que las posibilidades de un cambio de signo en el sistema de salud dependerá de que los ciudadanos decidan cambiar las características político-ideológicas del gobierno y de los integrantes del Congreso de la República. De no darse esa disposición ciudadana, seguramente las reformas no trascenderán los maquillajes y ajustes de un modelo que ha sido concebido, en su esencia, para facilitar el accionar de los agentes del mercado en el sector salud.

Con la activa participación de académicos y de otros actores sociales del país, se han elaborado varias propuestas de reforma estructural del SGSSS que demuestran que hay alternativas racionales, ponderadas y ajustadas a las condiciones socio-políticas coyunturales del país, sin que sea necesaria la intermediación del sector privado canalizada a través de la figura institucional de las EPS o de las Gestoras de Salud, según la terminología del reciente proyecto gubernamental de reforma. Estas propuestas tienen en común que formulan la reasignación de las responsabilidades plenas en la garantía del derecho al cuidado de la salud a las instituciones del Estado. Allí reside, precisamente, el nodo de la discordia por la cual el gobierno y la mayoría de la dirigencia política se resisten a aceptarlas. Empecinados en la defensa de la doctrina económica del mercado como el mecanismo por el cual supuestamente los recursos son mejor asignados, asumen que el Estado y sus instituciones son ineluctablemente ineficientes y corruptas. Pero omiten valorar el mérito que nuestra realidad le ha dado a aquella pretendida eficiencia e incorruptibilidad del sector privado y de los agentes del mercado.

Se requiere grandes esfuerzos para lograr que la sociedad abandone los prejuicios que interesadamente han sido creados y estimulados en contra de lo público y de la institucionalidad del Estado. Sin desmedro de la permanente actitud crítica y sancionatoria del conjunto de la sociedad contra quienes pervierten el sentido solidario y de responsabilidad social del Estado mediante acciones corruptas y negligentes, es necesario el establecimiento de un sistema de salud articulado alrededor del monopolio estatal en la orientación y gestión de los recursos. Tal sea ese el único modo de evitar que los grandes capitales financieros se enclaven en medio, poniendo los esfuerzos que la sociedad hace en función de la garantía del derecho a la salud en favor de sus intereses económicos.

Si se acepta como válida y conveniente esa funcionalidad afirmativa del Estado, seguramente se admitirá para su discusión elementos como los siguientes (y se habrá acertado en el desarrollo legislativo): “a) Asumir que la salud es un derecho humano fundamental, relacionado con la dignidad de todas las personas, y que por tanto su garantía no puede estar supeditado a las condiciones económicas de cada quien y a los mecanismos del mercado; b) Reclamar que el Estado, como instancia social cohesionadora de la voluntad colaborativa de todos los miembros de la sociedad, asuma su responsabilidad indeclinable de garantizar el derecho fundamental a la salud; c) Rescatar la gobernabilidad afirmativa del sistema de salud por parte del Estado en todos los niveles de la administración pública; d) Reconstituir las políticas de salud pública con base en los fundamentos científicos de esa disciplina y en la formación de una masa crítica de salud pública que asuma el liderazgo de esas políticas; e) Comprometerse con instrumentos fundamentales de la salud pública tales como la planificación de largo plazo (con compromisos intersectoriales que intervengan los determinantes sociales de la salud), la Atención Primaria en Salud, la participación comunitaria y las políticas de promoción de la salud y de prevención de las enfermedades;

f) Proponerse el logro de la equidad en salud como el indicador que señale los aciertos del sistema de salud que se diseñe” (6).

Adicionalmente, sería conveniente, tal como fue comentado en una editorial previa (7), que en dicho marco legislativo se incluyan los elementos que favorezcan la implementación de la actual Política Farmacéutica Nacional (Documento CONPES Social 155, agosto 30 de 2012), y se logre de esa manera el espacio social y legal para que se valore justamente la importancia del sector farmacéutico en la reorganización del sistema de salud.

**Álvaro Cardona**

Doctor en Ciencias Socio-Sanitarias y Humanidades Médicas. Universidad Complutense (Madrid, España)  
Magister en Salud Pública. Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia)  
Médico. Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Congreso de la República. Proyecto de ley ordinaria 210 de 2013 por medio de la cual se redefine el Sistema General de Seguridad Social en Salud y se dictan otras disposiciones.
2. Ministerio de la Protección Social de Colombia. Decreto número 4975 de 2009, por el cual se declara el Estado de Emergencia Social.
3. Corte Constitucional de Colombia. Sentencia C-252 de 2010. Revisión constitucional del Decreto Legislativo número 4975 del 23 de diciembre de 2009, Por el cual se declara el estado de emergencia social. Magistrado Ponente: Dr. Jorge Iván Palacio Palacio.
4. Congreso de la República de Colombia. Ley 100 de 1993, por la cual se crea el sistema de seguridad social integral y se dictan otras disposiciones.
5. Congreso de la República de Colombia. Ley 1438 de 2011, por medio de la cual se reforma el Sistema General de Seguridad Social en Salud y se dictan otras disposiciones.
6. Cardona A. Salud Pública, Estado y Sociedad. Itinerario de una reflexión crítica. (en prensa).
7. Amariles P, Restrepo LG, Rossi F. El sector farmacéutico como pieza clave en la reorganización de los sistemas de salud. *Vitae*. 2012 Sep 17; 19 (2): 153 - 155.

# EVALUATION OF THE PHYSICO-CHEMICAL, PHYSICAL AND SENSORY PROPERTIES OF FRESH CAPE GOOSEBERRY AND VACUUM IMPREGNATED WITH PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS

## EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, FÍSICAS Y SENSORIALES DE UCHUVAS FRESCAS E IMPREGNADAS AL VACÍO CON COMPONENTES FISIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

Ruth F. PEÑA C.<sup>1\*</sup>, Misael CORTÉS R.<sup>1</sup>, Olga I. MONTOYA C.<sup>1</sup>

Received: 13 March 2012 Accepted: 06 May 2013

### ABSTRACT

**Background:** Functional Foods are considered nowadays by consumers as the range of foods of major interest. **Objectives:** The aim of the present work was the evaluation of color, texture and sensorial properties of fresh Cape Gooseberry (FG) and vacuum impregnated Cape Gooseberry (IG) with calcium and vitamins B<sub>6</sub>, C, D and E during storage at 4°C. **Methods:** Entire cape gooseberries were vacuum impregnated (VI) with tocopherol and cholecalciferol emulsified in aqueous phase with sucrose, ascorbic acid, folic acid, calcium chloride, calcium fumarate, low methoxyl pectin, isolated soy protein, tensoactives and preservatives. The texture was determined from puncture assays, and the color from the CIE Lab coordinates. The sensorial profile was determined with the aid of trained panelists, through a multidimensional approach of characteristic descriptors of general appearance, odor, taste and texture. **Results:** The instrumental values of color and texture for IG were significantly different from the FG, because are being softer, more elastic, darker, brighter and of less color saturation. The samples of FG and IG presented intense sensorial characteristics in the descriptors orange color, brightness, spherical uniformity, smooth surface, fresh appearance, odor, cape gooseberry characteristic taste and frutal, fleshy texture, juicy, firmness and turgidity. By the effect of VI process the most relevant significant differences were the descriptors orange color, superficial stains, fresh appearance, sweet taste and cape gooseberry characteristic taste, soft texture, firmness and juicy; whereas for the effect of storage time were fresh appearance, dehydrated appearance, peduncle cicatrization, aromatic odor, overripe, cape gooseberry characteristic taste, frutal taste, soft texture, juicy, firmness and turgidity. **Conclusions:** The VI significantly affects the objective assessment of color and texture, finding correspondence with the sensorial evaluation; nonetheless, the general quality of the FG presented a greater score than those presented by IG.

**Keywords:** *Physalis peruviana* L., vacuum impregnation, color, texture, sensory evaluation.

### RESUMEN

**Antecedentes:** Los alimentos funcionales son considerados actualmente la gama de alimentos de mayor interés por los consumidores. **Objetivos:** El objetivo fue evaluar el color, la textura y las propiedades sensoriales de uchuva fresca (UF) e impregnada al vacío (UI) con calcio y vitaminas B<sub>6</sub>, C, D y E, durante

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Agrícola y de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia –Sede Medellín. Medellín, Colombia.

\* Corresponding author: rfpnac@unal.edu.co



el almacenamiento a 4°C. **Métodos:** Las uchuvas enteras fueron impregnadas al vacío (IV) con tocoferol y colecalciferol emulsificados en fase acuosa de sucrosa, ácido ascórbico, ácido fólico, cloruro de calcio, fumarato de calcio, pectina de bajo metoxilo, proteína de soya aislada, tensoactivos y conservantes. La textura se determinó a partir de ensayos de punción y el color de acuerdo a las coordenadas del CIE-Lab. El perfil sensorial se realizó con panelistas entrenados a través de una aproximación multidimensional de descriptores propios del aspecto general, olor, sabor y textura. **Resultados:** Las valoraciones instrumentales de color y textura en las UI fueron significativamente diferentes que las UF, por ser más blandas, elásticas, oscuras, y brillantes y de menor saturación de color. Las muestras UF y UI presentaron intensas características sensoriales en los descriptores color anaranjado, brillo, uniformidad esférica, superficie lisa, aspecto fresco, olor y sabor característico a uchuva y frutal, textura carnosa, jugosa, firme y turgencia. Por efecto del proceso IV las diferencias significativas más relevantes fueron: los descriptores color anaranjado, manchas superficiales, aspecto fresco, sabor dulce y característico a uchuva, textura blanda, firmeza y jugosidad; mientras que por efecto del tiempo de almacenamiento fueron: aspecto fresco, apariencia deshidratada, la cicatrización del pedúnculo, olor aromático, sobremaduración, sabor característico a uchuva, sabor frutal, textura blanda, jugosidad, firmeza y turgencia. **Conclusiones:** La IV afecta significativamente las valoraciones objetivas de color y textura, encontrándose correspondencia con la valoración sensorial; sin embargo, la calidad general de la UF presentó un mayor score que las UI.

**Palabras clave:** *Physalis peruviana* L., impregnación al vacío, color, textura, evaluación sensorial.

## INTRODUCTION

Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) is a pulpy round berry of the Solanaceae family, a typical fruit from the Andes region in South American. The pulp (pericarp) is completely edible and smooth, it contains numerous small lens-shaped seeds and its peel (exocarp) is thin, elastic, smooth and shiny (1, 2). The fruit is entirely covered by a calyx that protects it from the environment, segregating a sticky substance produced by glandular tissues located at the base, whose function is to repel insect attack (3). Cape gooseberry colombian ecotype is characterized by a bright orange color, some intense pleasant aromas, and a balanced sweet-acid taste (14-15° Brix, acidity from 1.6 to 2.0% and pH from 3.6 to 4.1) (4). This fruit has high vitamins A and C levels (5, 6), as well as minerals such as calcium, iron and phosphorus (7). Those features have let identifying gooseberry as a promising fruit for exportation by the Colombian Ministry of Agriculture and Rural Development (8, 9). Additionally, cape gooseberry has been recognized for its medicinal properties such as anti-asthmatic, diuretic, antiseptic, sedative, analgesic, antiparasitic, antidiabetic among others (10).

In human feeding, new trends are associated with fruits and vegetables consumption due to their well-known nutritional properties, and in the healthy food purchases (11, 12). This behavior has encouraged the Minimally Processed Foods

Industry to develop products with functional characteristics (13). Functional foods look as conventional products, they are consumed as a portion of a normal diet, and besides their nutritive basic function, they operate in multiple organ systems like gastrointestinal, cardiovascular and immune, but also in nutrient metabolism, gene expression, oxidative stress and the psychic sphere (14).

Vitamins are organic compounds that humans need for their appropriate cells functioning. Some of them are not synthesized in human organism, for example, vitamins C and E, which makes necessary to ingest them from foods. Vitamins C and E have excelled by their antioxidant power because they counteract free radicals, which are known for its participation in the initiation phases of some degenerative diseases (15). Likewise, vitamin B<sub>9</sub> or folic acid, is required in DNA and RNA synthesis, and in some aminoacids metabolism, preventing defects in the fetus neural tube, like Spina Bifida (16); for this reasons, they are indispensable in expectant mother's diet. The most important function of vitamin D, is to stimulate the absorption, fixation and elimination of calcium, thanks to the specific receptors that human beings have in their intestines, bones and kidneys (17, 18), which is necessary for the development and normal growing of skeleton and teeth, with a sufficient calcium intake. This mineral consumption is very important in childhood and adolescence for developing a good peak bone mass, especially in females. A minimally

processed product with those benefits generates national and international expectation, especially in women who have a higher concern about diet – health relation (19).

One effective process for the development of Functional Foods is the vacuum impregnation (VI), which is a process of mass transfer of physiologically active compounds (PAC), contained in an impregnation liquid, to the porous tissues, thus promoting compositional changes in short time and low temperatures (20). Gooseberry has been fortified through the VI technique, obtaining minimally processed products with high levels of physiologically active compounds (PAC) and are stable during storage (21 - 23). Some other researchers have demonstrated the IV effectiveness in incorporating PAC into porous fruits or vegetables matrices (e.g. Vitamin E in apple, strawberry, cape gooseberry, celery and cucumber; calcium, zinc and vitamins C and E in edible mushrooms and antioxidants in banana) (24 - 29).

Some biochemical changes along with water loss, enzymatic polysaccharides hydrolysis (starch, pectin and cellulose), and respiration increasing rate are produced during vegetables maturation and senescence. This factors cause the tissues softness (30). The color change in fruits is due to the reduction of enzymes responsible of chlorophyll synthesis (compounds that give them green color), while those that synthesize carotenoids and xanthophylls are activated; these substances give yellow and red colors respectively. The double bonds breaking (oxidation) of these pigments causes a decrease in brightness, and after the gray colors development (31). All these normal senescence processes, along with the microbial growing, affect notoriously the sensory properties of fruits, which demerits its general quality (32).

Functional foods, besides providing health benefits that prevent illnesses, should be desirable from the sensory point of view, presenting nice colors, textures, shapes and flavors. One of the most important methods in sensory evaluation is the descriptive tests; this allows finding the most relevant features that provide maximum information of a specific product. This assessment is based on the detection and description of qualitative and quantitative sensory aspects by trained taster groups, who provide quantitative values that are proportional to the perceived intensity of every

attribute. They are able to perceive changes caused by a treatment or by the time (33).

The aim of the present investigation is to evaluate color, texture and sensory properties in fresh gooseberry (no treated) and vacuum impregnated gooseberry with calcium and vitamins B<sub>9</sub>, C, D and E, during storage at 4°C.

## MATERIALS AND METHODS

### Vegetable raw material

It was used fresh cape gooseberries (FG) (*Physalis peruviana* L.) colombian ecotype (La Unión, Antioquia), with weights between 6 and 8 g without calyx, in a maturity level between 4 and 6 according to the Colombian Technical Standard, NTC 4580 (34). FG was disinfected by immersion in a chlorine solution of 50 ppm.

### Vacuum Impregnation

The ingredients of the impregnation emulsion (IE) were ascorbic acid (vitamin C), cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>), DL- $\alpha$ -tocopherol acetate (vitamin E), folic acid (vitamin B<sub>9</sub>), calcium chloride, calcium fumarate ( $\Sigma$  8.35% p/p), sucrose, Tween 80, Span 60, potassium sorbate, low methoxyl pectin, isolated soy protein and potable water ( $\Sigma$  91.65%). The IE was homogenized in an Ultraturrax machine (UTL 50 INLINE, Janke & Kunkel IKA® - Labortechnik) at 10.000 rpm during 10 minutes. The quantity of each PAC is the result of a mass balance between fruit and IE (20), so it was previously obtained the impregnation mass fraction ( $X = 0.0347 \pm 0.0067$ ) (1) according to methodology described by Fito *et al.*, 1996 (35), and Salvatori *et al.*, 1998 (36). Fortification criteria selected was: 20% of the daily reference values (DRV) for calcium and vitamins D and B<sub>9</sub>, and the 50% for vitamin E, in a portion size of 200 g, according to Ministry of Social Protection, 2011 (37). VI process was performed in a vacuum stainless steel chamber, according to methodology described by Fito *et al.*, 1996 (35), and Salvatori *et al.*, 1998 (36), with a vacuum pressure of 31.4 mm Hg during 5 minutes, followed by 5 minutes at local barometric pressure (640 mm Hg).

### Storage

The FG and the impregnated cape gooseberries (IG) where packed in perforated thermoformed boxes of polyethylene terephthalate, with  $\approx$ 200 g



capacity, and they were stored at 4°C during 21 days in light absence.

### Physicochemical Properties

It was measured: Soluble solids (°Brix) in a manual refractometer (Leica Auto ABBE) at 20°C (AOAC 932.12/2002); titratable acidity, expressed as citric acid percentage (AOAC 942.15/2002); and moisture, by drying at 105°C during 6 hours (A.OAC 925.45/2002) (38).

### Instrumental texture

For texture determination was used the texture analyzer (TA:XT2 Stable Micro Systems), by puncture tests with 50 kg load cell, 2 mm/s speed and 10 mm penetration distance. The tests were performed in the equatorial zone of all gooseberries with a metallic plunger 2 mm in diameter. During puncture, force in Newton (N) was plotted vs. the distance in millimeters (mm) traveled by the plunger, and it was calculated: the epidermis force ( $F_{max}$ ), that represents the maximum mechanic resistance or force data; pulp force ( $F_{pulp}$ ), from the average of the semi constant data force recorded after  $F_{max}$ ; and the elasticity module ( $\epsilon$ ), calculated as the slope of data before reaching  $F_{max}$ , where higher values correspond to lower elasticity.

### Instrumental color

It was determined the color coordinates CIE- $L^*a^*b^*$ , hue ( $h_{ab}^*$ ) and chroma ( $C_{ab}^*$ ), from the reflection spectrum of FG and IG, taken on the equatorial zone and peduncle area, using the spectrophotometer X-RITE, SP64 model, with the illuminant  $D_{65}$  and the 10° observer as reference.

### Sensory Evaluation

A sensory profile was performed by multidimensional approximation method according to the Colombian Technical Standards NTC 3501 (39), NTC 3925 (40) and NTC 3932 (41), in fresh and impregnated gooseberries with 3, 18 and 21 storage days, with 10 training judges, in individual panels with artificial light at 25°C and 72% relative humidity. The descriptors of general appearance,

odor, flavor and texture in FG and IG were identified and selected, allowing getting the maximum information about its sensory attributes. Selected descriptors were assessed on a hedonic scale from 0 to 5, where zero represents no perception, 1 is weak, 2 is less weak, 3 is average, 4 is less strong and 5 is strong; furthermore, general quality was assessed on a scale of 0 to 3, where 0 is no quality.

### Data analysis

Completely randomized Factorial design ( $T \times Z \times D \times L \times R$ : treatments  $\times$  zones  $\times$  days  $\times$  lots  $\times$  repetitions) was performed for: physicochemical properties ( $2 \times 1 \times 1 \times 2 \times 5$ ); texture ( $2 \times 1 \times 8 \times 3 \times 5$ ); color ( $2 \times 2 \times 8 \times 3 \times 5$ ); microbiological evaluation ( $2 \times 1 \times 8 \times 3 \times 2$ ); and sensory evaluation ( $2 \times 1 \times 3 \times 1 \times 10$ ). Data was analyzed using an analysis of variance ANOVA, applying the LSD method (Low significant differences) as multiple comparisons method, with 95% significance ( $\alpha = 0.05$ ) and 80% of power, using the statistic software Statgraphics Centurion XV.

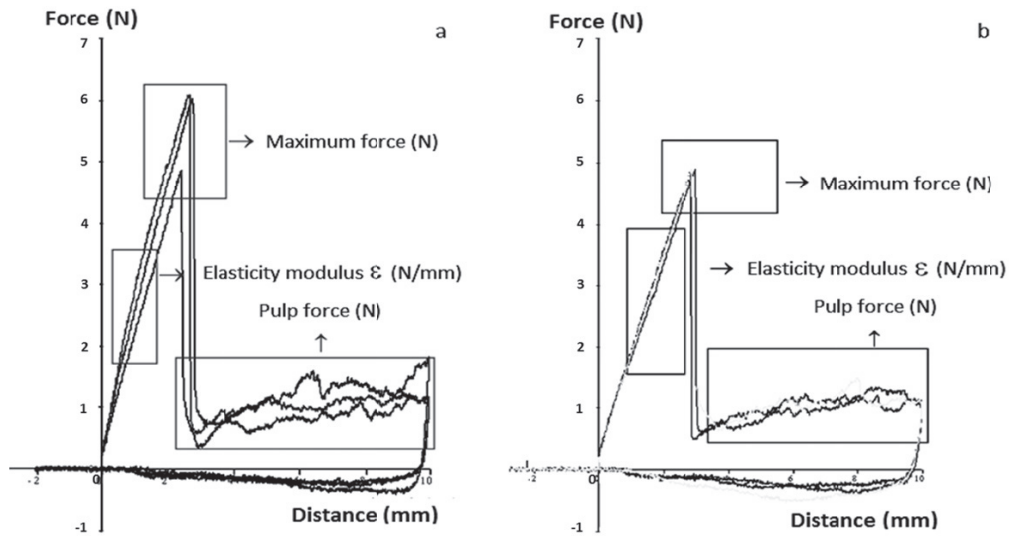
## RESULTS

### Physicochemical properties

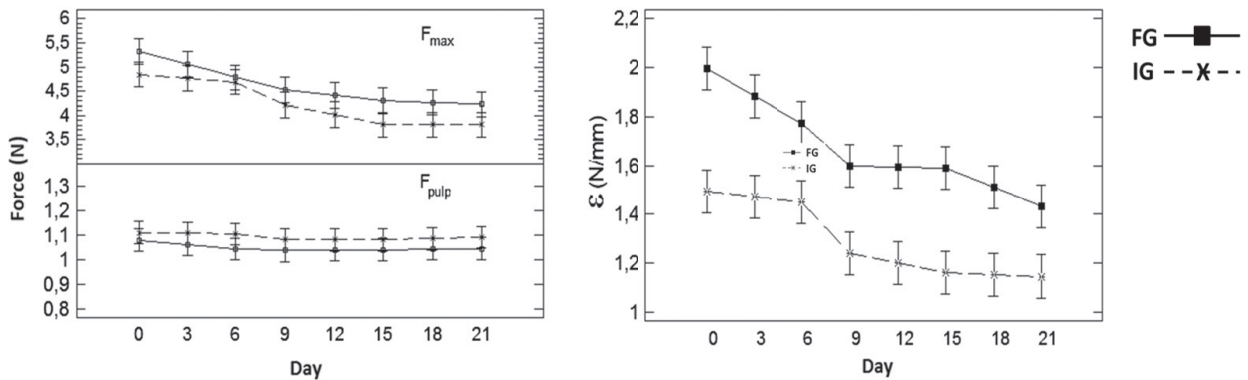
ANOVA did not report significant differences ( $p < 0.05$ ) for VI effect in physicochemical analysis. These are the results:  $14.74 \pm 0.6$  and  $15.10 \pm 0.5$  °Brix;  $1.65 \pm 0.31\%$  and  $1.67 \pm 0.34\%$  acidity;  $79.87 \pm 0.73\%$  and  $79.98 \pm 0.72\%$  moisture for FG and IG, respectively.

### Instrumental texture

Figure 1 presents the force–distance curves obtained in FG and in IG zero-day. In each one can be observed the linear increase of the force, whose slope corresponds to elasticity module ( $\epsilon$ ). In both, a peak is also seen, which corresponded to the epidermis breaking point or  $F_{max}$ . The line after some recovery has homogeneous force values corresponding to  $F_{pulp}$ . Figure 2 presents  $F_{max}$ ,  $F_{pulp}$  and  $\epsilon$  behavior over time.



**Figure 1.** Gooseberries texture curves (a) FG, and (b) IG zero-day.



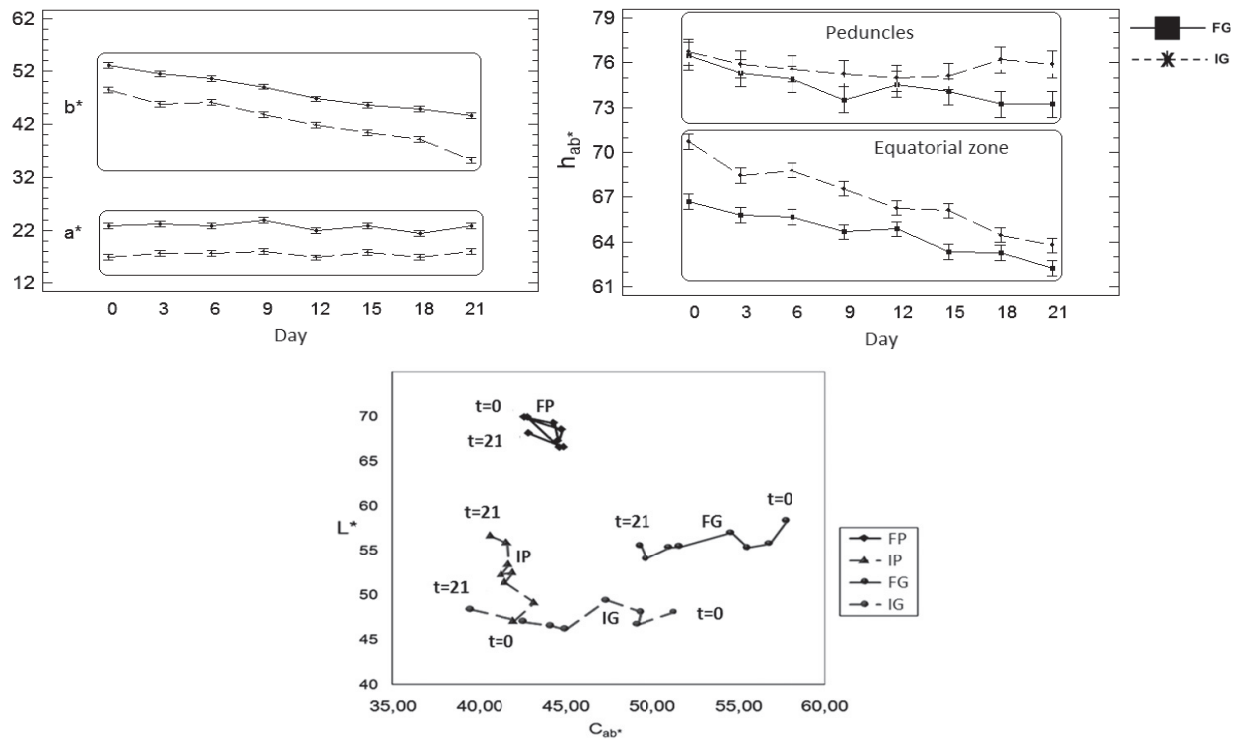
**Figure 2.**  $F_{max}$ ,  $F_{pulp}$  and  $\varepsilon$  analysis in FG and IG during storage at 4°C.

It is appreciated that for VI effect,  $F_{max}$  decreased significantly, and therefore the product became more elastic; i.e.,  $\varepsilon$  values recorded were statistically lower in IG than in FG.  $F_{pulp}$  did not show statistical differences by treatment, but the average values of IG were slightly higher; this short difference indicates that impregnation with weak gelation agents contribute to the pulp strength. By time effect, both IG and FG showed statistical differences in  $F_{max}$  and  $\varepsilon$ , with decreasing tendency.  $F_{max}$  in both treatments presented the same homogenous groups ( $p < 0.05$ ): 0 - 6 days; 9 - 21 days; while  $\varepsilon$  presented four groups

in FG (0 - 3, 3 - 6, 6 - 15 and 9 - 21 days) and two in IG (0 - 6 and 9 - 12 days).

### Color

Figure 3 shows the evolution of the green-red chromaticity ( $a^*$ ), yellow-blue chromaticity ( $b^*$ ), hue ( $h_{ab}^*$ ), the luminosity  $L^*$  and saturation or intensity of color ( $C_{ab}^*$ ) for storage at 4°C, in the peduncle (IP → impregnated gooseberry peduncle and FP → fresh gooseberries peduncles) and in the equatorial zone of the FG and IG.



**Figure 3.** Evolution of color parameters  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h_{ab}^*$ ,  $L^*$  y  $C_{ab}^*$  in peduncle (FP and IP) and in equatorial zones (FG and IG) during storage at 4°C.

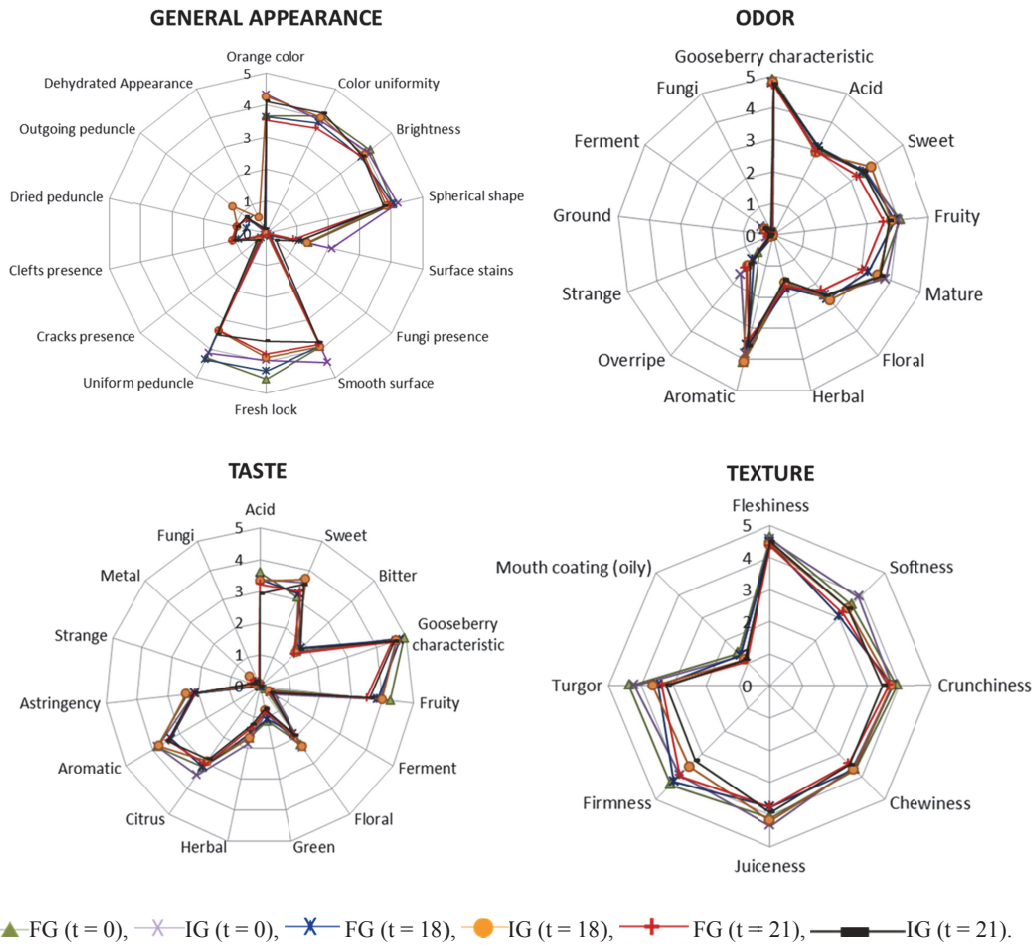
There were significant differences ( $p < 0.05$ ) for VI effect, in all color parameters. The equatorial zone and peduncle of IG showed lower values for  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  and  $C_{ab}^*$ , and higher values for  $h_{ab}^*$  that FG (see figures 3 and 4). By time effect, there were differences in  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  and  $h_{ab}^*$  parameters in the equatorial zones of FG and IG, and there were differences too in  $L^*$  of the IP. The FP had no significant changes in color parameters during storage.

### Sensory evaluation

Figure 4 shows the sensory profile of FG and IG in their general appearance, texture, odor and taste at zero, 18<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> storage day. For VI effect there were not significant differences ( $p > 0.05$ ) in the general appearance variables: color uniformity, brightness, spherical shape homogeneity, fungi presence, smooth surface, cracks presence, clefts presence, dried peduncle; but showed significant differences ( $p < 0.05$ ) in orange color, surface stains, fresh look, uniform peduncle, outgoing peduncle and dehydrated appearance. Over time,

significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) were found in: fresh look, uniform peduncle, clefts presence and dried peduncle.

The odor profile showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the descriptors: acid, mature, sweet, fruity, floral, herbal, strange, ferment, overripe, fungi and gooseberry characteristic odor by effect of VI and time. Ground odors and aromatic descriptors presented significant differences ( $p > 0.05$ ) over time. The taste profile did not present significant statistical differences ( $p > 0.05$ ) in the descriptors: acid, bitter, ferment, floral, green, herbal, citrus, aromatic, astringent and fungi by effect of VI and time; but showed differences in sweet taste by VI effect (higher score in IG), and by time in gooseberry and fruity characteristic descriptors (loosing taste). For VI effect, texture profile results showed significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) in juiciness and firmness, but did not in fleshiness, softness, crunchiness, chewiness, turgor and oily feeling (mouth coating).



**Figure 4.** FG and IG sensorial profile by multidimensional approximation.

For time effect there were statistically differences ( $p < 0.05$ ) in softness, juiciness, firmness and turgor descriptors, results that are related with those obtained by instrumental techniques ( $F_{max}$  and moisture). Table 2 presents the quality average score of FG and IG. The ANOVA reported significant differences in general quality by both VI and time effects; where the higher values were obtained in FG and at zero-day. All dates corresponded to a high quality, except for IG on 21<sup>st</sup> day that correspond to a medium quality.

**Table 2.** General quality of FG and IG in storage at 4°C.

Product	Storage (day)	Score
FG	0	2.9
	18	2.6
	21	2.4
IG	0	2.6
	18	2.4
	21	2.2

## DISCUSSION

### Physicochemical properties

Some authors have reported similar values in FG (2, 10, 22, 42, 43). In all parameters it was observed that IG average values are slightly higher than those of FG, due to the IE coming into gooseberries porous, as water-based emulsion provides 18% w/w soluble solids of sugars, salts and organic acids, among other components. However, due to low incorporated liquid quantity, physicochemical parameters are absorbed by standard deviations.

### Instrumental Texture

Similar trends in texture were found by Botero, 2008 (23) and Ciro *et al.*, 2007 (44), while Marin *et al.*, 2011 (21), found no significant differences in  $F_{max}$  during storage for impregnation with probiotics. Restrepo *et al.*, 2009 (22), found significant differences in  $F_{pulp}$  by effect of VI, due to the hydrodynamic

mechanism that leads to structural changes caused by pressure changes (45). Botero, 2008 (23), found no significant difference in  $\epsilon$ , his value is lower than that obtained in the present study, although no gelling agents were used in the IE, which helps to improve the texture. In general, fruits present mechanical properties such as viscous flow and elastic solid jointly (46). Its texture changes are mainly caused by water loss and the hydrolysis of starch, pectin and other cell wall components by enzymatic ways (47, 48), additionally, cape gooseberry is characterized by its high pectinases content (49).

Adding calcium via VI has improved the texture of some fruits, given the interaction with pectic components of the cell wall (50-52); however, the decrease of  $\epsilon$  and  $F_{\max}$  in the IG might be attributed to multiple factors: ripening process (2), the increase of moisture in the epidermis due to IE (21, 22), the hydrodynamic mechanism and relaxation phenomena caused by the pressure changes that the fruit experiences during the VI process (53).

### Instrumental color

$L^*$  values decreasing by treatments are attributed to IE presence on intercellular spaces or pores, which makes the refractive index more uniform, thus enhancing the light absorption in surface, therefore impregnated samples are seen darker than the untreated ones. Some research has found similar results in impregnation processes, for example, green banana impregnated with antiparadeants (54), celery and cucumber impregnated with vitamin E (55), cape gooseberry impregnated with *Lactobacillus casei* (56), apple impregnated with lactic acid bacteria (57) and apple impregnated with vitamin E (58). The gradual increase of  $L^*$  in IP during storage is attributed to IE mobility from this area to the interior of the fruit, a behavior that was also found by Marín, 2008 (59).

Decreasing  $b^*$ ,  $h_{ab^*}$  and  $C_{ab^*}$  values over time are associated with the red and yellow pigments dilution in the IE and with physiological changes during fruit ripening. Similar behaviors in color parameter were found by some authors after impregnation processes (22, 23); however, other researchers found an increase in chromaticity  $b^*$  over time (59).

### Sensory evaluation

Few sensorial evaluation studies of impregnated products with PAC have been performed. The effect of VI process on cape gooseberry produces some alterations in the general appearance perceived by the

panelists. A greater perception in the intensity of the orange color is due to the incorporation of the EI in the intercellular spaces of the fruit, which is coherent with the aforementioned instrumental results (figure 3). Similar results have been found in the sensorial assessment of cape gooseberry and strawberries impregnated with vitamin E (60), and cape gooseberry impregnated with *L. Plantarum* and *L. Casei* (61). The uniformity of color in the recently impregnated cape gooseberries was similar to the FG; however, during storage the scores of IG tend to better values than those presented by FG, which is attributable to the diffusion of the EI from the intercellular spaces (close to the peduncle) to the interior of the fruit, which is in turn coherent with the instrumental measure up to day 15<sup>th</sup>, where the  $\Delta h_{ab^*}$  (peduncles – equatorial zone) in the IG is lower than the FG, for each control time. The sensorial perception of superficial stains in FG samples is spontaneous, where the peduncle zone is much more bright ( $L^* \gg$ ) than the equatorial ( $L^* \ll$ ), the maximum score of this descriptor did not surpass the magnitude of 2.5, but is greater in the peduncle surrounding zone of the IG at time 0 (equally consistent with the instrumental results), and during storage decrease. The fresh appearance of the FG and IG showed a decrease with time, which is consistent with the increase of dehydrated appearance score, due to the fruit's physiology (62, 63). The cicatrization appearance in the peduncle surrounding is present in both samples, with scores below 1.5, but the VI process may induce to fissures because of the stress caused by the pressure changes throughout the process. The presence of clefts, although being of minor concern, may be related with the dehydration of the fruit during its respiration process (62, 63).

In both samples the greater intensity of the odor descriptors was found in cape gooseberry characteristic, frutal, aromatic, acid, sweet and ripe, tending to keep its score throughout the time, expect by the aromatic odor which decrease due to the physiological process of ripening during storage, appearing losses in volatile compounds, as well as color changes, texture and taste (62, 63). The averages of sweet odor score were greater in the IG samples than in FG, because of the resulting impregnated sucrose in the waxy layer of the fruit.

The greater intensity of the taste descriptors was found in cape gooseberry characteristic, frutal, aromatic, acid and sweet. The sucrose content of EI confers a greater perception of sweetness in the IG than in the FG, keeping constant over time. Similar



results have been found in apple, cape gooseberries and strawberries impregnated with vitamin E (20, 60), in cape gooseberry impregnated with probiotic microorganisms (61) and orange skin (64). In the FG the score of cape gooseberry characteristic taste and the frutal taste decrease with time, whereas for the IG decrease the herbal taste and critic, which may be equally attributable to the biochemical process of ripening, and also to the decreasing of its acidity over time, that induce a decrease in the acidity-sweetness balance and a more noticeable difference in the perception of taste than at time 0. The strange, metallic and fungi taste were not relevant descriptors during the sensorial assessment.

In general, the descriptors of texture have a tendency to decrease its score with respect to time, being more relevant the soft texture, juicy, firmness and turgidity. The physiology of the fruit ripening in both FG and IG plays a very important role in the texture, which was consistent with the instrumental results (figure 2).

## CONCLUSIONS

The VI process does not significantly affects the physicochemical properties of the fruit, but changes in physical properties like color and texture were observed through the instrumental analysis. The IG samples present lower red chromaticity ( $\lll a^*$ ), lower yellow chromaticity ( $\lll b^*$ ), lower color saturation ( $\lll C_{ab}^*$ ) and are darker ( $\lll L^*$ ) than FG samples; besides, they are softer ( $\lll F_{max}$ ) and more elastic ( $\lll \epsilon$ ). The descriptors of greater intensity in the sensorial assessment of both samples were: orange color, brightness, spherical uniformity, smooth surface, fresh appearance, odor and cape gooseberry characteristic taste, frutal taste, firmness, fleshy texture and juicy. The VI process produces significant changes in the sensorial perception of the cape gooseberry, mainly by conferring a greater intensity of orange color and superficial stains, less fresh appearance, greater sweetness, less cape gooseberry characteristic taste, softer texture, less firmness and juicy; whereas for effect of storage time there is a sustenance of the orange color, and changes mainly due to decrease of the fresh appearance, decrease of superficial stains, increase in the peduncle cicatrization and cleft presence, decrease in frutal odor and taste, softer texture and decrease of juicy and firmness. The general quality of the FG exhibited a greater score than the IG.

## REFERENCES

- Peña R. Desarrollo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesada adicionada con calcio y vitaminas B<sub>6</sub>, D y E [Master Thesis]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2010. 103p.
- Márquez C, Trillos O. Evaluación físico-química y sensorial de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Vitac. 2009 Ene-Abr; 16 (1): 42-48.
- Mazorra M, Quintana A. Aspectos anatómicos de la formación y crecimiento del fruto de uchuva *Physalis peruviana* (Solanaceae). Acta Biológica Colombiana. 2006; 11 (1): 69-81.
- Gutiérrez T, Hoyos O. Determinación del contenido de ácido ascórbico en uchuva (*Physalis peruviana* L.), por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2007; 72 (5): 70-79.
- Ávila J, Fischer G, Miranda, D. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C. Acta Agronomía Colombia. 2006; 55 (4): 29-38.
- Encina C, Ureña M, Repo P. Determinación de compuestos bioactivos del aguaymanto (*Physalis peruviana*, Linnaeus, 1753) y de su conserva en almíbar maximizando la retención de ácido ascórbico. Encuentro Científico Internacional ECIPERU. 2007; 4 (1): 6-10.
- Repo R, Encina C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2008; 74 (2): 108-124.
- Corporación Colombia Internacional CCI. Perfil del Producto Uchuva. Sistema de Inteligencia de Mercados. 2002; 13.
- Corporación Colombia Internacional CCI. Monitoreo internacional: uchuva fresca.
- Puente L, Cortés M, Pinto C, Castro E. *Physalis peruviana* Linnaeus, The Multiple Properties of a Highly functional fruit: A review. Food Res Int. 2011 Aug; 44 (7): 1733-1740.
- Abadías M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. International J Food Microbiol. 2008; 123 (1-2): 121-129.
- Huguet M. ¿Qué hay de nuevo en... Propiedades saludables y nutritivas de frutas y hortalizas? Barcelona, Spain: Ediciones de Horticultura, S.L.; 2000. 49p.
- Ragaert P, Verbeke W, Devlieghere F, Debevere J. Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits. Food Qual Prefer. 2004 Apr; 15 (3): 259-70.
- Silveira M, Monereo S, Begonia B. Alimentos funcionales y nutrición óptima, ¿cerca o lejos? Revista Española de Salud Pública. 2003; 77 (3): 317-331.
- Soto M, Ravento H. Papel del estrés oxidativo en la esquizofrenia. Acta Méd Costarric. 2008; 50 (3): 197-202.
- Fohr I, Prinz R, Bronstrup A, Bohlmann A, Nau H, Berthold H. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma Homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methyltetrahydrofolate or folic acid in healthy young woman. J Clin Invest. 2002; 75 (2): 275-282.
- Holick M. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. J Clin Invest. 2006; 116 (8): 2062-2072.
- Feldman D, Malloy P, Gross C. Osteoporosis. Vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. Stanford, California: Department of Medicine, Division of Endocrinology, Stanford University School of Medicine; 2001. Chapter 3, Vitamin D: Biology, Action, and Clinical Implications. 1022p.
- Prada G, Gamboa E, Jaime M. Representaciones sociales sobre alimentación saludable en población vulnerable. SaludUIS. 2006; 38: 181-188.
- Cortés, M. Desarrollo de productos de manzana deshidratados enriquecidos con vitamina E [Doctoral Thesis]. [Valencia, España]: Universidad Politécnica de Valencia; 2004. 254p.
- Marín Z, Cortés M, Montoya O. Uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo Colombia, mínimamente procesada inoculada con la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 mediante la técnica de impregnación a vacío. Revista Chilena de Nutrición. 2011; 37 (4): 461 – 472.
- Restrepo A, Cortés M, Marqués C. Uchuvas (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesadas fortificadas con vitamina E. Vitac. 2009 Ene-Abr; 16 (1): 19-30.

23. Botero A. Aplicación de la ingeniería de matrices en el desarrollo de uchuva (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesada fortificada con calcio y vitaminas C y E [Master Thesis]. [Medellín, Colombia]: Universidad de Antioquia; 2008. 178p.
24. Cortés M. Ingeniería de matrices: una herramienta efectiva para la generación de valor agregado en alimentos porosos. Vitae. 2012 Jun; 19 (S2): S39 - S40.
25. Pinto L, Cortés M, Giraldo G. Evaluación del color durante el almacenamiento de la pulpa de banano verde impregnada al vacío con soluciones antipardeantes. Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011; 9 (2): 8-22.
26. Martelo Y, Cortes R, Restrepo D. Dinámica de impregnación al vacío en apio (*Apium graveolens* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.). MVZ Córdoba. 2011; 16 (2): 2584 - 2592.
27. Restrepo A, Cortés M, Rojano B. Potenciación de la capacidad antioxidante de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) por incorporación de vitamina E utilizando la técnica de impregnación a vacío. Vitae. 2010 May-Ago; 17 (2): 135-140.
28. Cortés M, Chiralt A, Suarez H. Influence of storage conditions on freeze-dried apple fortified with vitamin E. Vitae. 2009 Jan-Apr; 16 (1): 31-41.
29. Ruiz M. Aplicación de la ingeniería de matrices en el desarrollo de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) mínimamente procesados, fortificados con vitaminas C, E y minerales calcio y zinc [Master Thesis]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2009. 109p.
30. Mohamed R. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*). Food Res Inter. 2011 Aug; 44 (7): 1830-1836.
31. Ávila JM, Fischer P, Miranda, D. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C. Revista Agronomía Colombiana. 2006; 24 (1): 77-86.
32. Novoa R, Bojaca M, Galvis J. Fruit maturity and calyx drying influence post-harvest behavior of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) stored at 12 °C. Revisita Agronomía Colombiana. 2006; 24 (1): 77-86.
33. Meilgaard M, Civille G, Carr B. Sensory evaluation techniques. 3ed. Boca Raton, Londres, New York, Washington: CRS Press LLC; 1999.
34. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana NTC 4580. Frutas frescas: Uchuva. Especificaciones. Bogotá, ICONTEC; 1999. 17p.
35. Fito P, Andrés A, Chiralt A, Pardo P. Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. J Food Eng. 1996; 27 (3): 229-240.
36. Salvatori D, Andrés A, Chiralt A, Fito P. Characterizations of some properties of fruits related to Vacuum Impregnation. J Food Process Eng. 1998; 21: 59-73.
37. Ministerio de Protección Social. Resolución 333 de 2011. República de Colombia.
38. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis. 17<sup>th</sup> ed. Arlington, VA. AOAC International. 2002.
39. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana, NTC 3501. Análisis sensorial. Vocabulario. Bogotá, ICONTEC; 2004. 24p.
40. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana, NTC 3925 Guía general. Bogotá, ICONTEC; 1996. 25p
41. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Norma Técnica Colombiana, NTC 3932. Identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por una aproximación dimensional. Bogotá, ICONTEC; 1996. 31p.
42. Mohamed R. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*). Food Res Inter. 2011 Aug; 44 (7): 1830-1836.
43. Lancho O, Velandia, G, Fischer, G, Varela, N, García, H. Comportamiento de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en poscosecha bajo condiciones de atmósfera modificada activa. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2007; 8 (1): 61-8.
44. Ciro H, Pérez S. Estudio preliminar de la resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para fruta de uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista de la Facultad Nacional de Agronomía. 2007; 60 (1): 3785-3796.
45. Martínez J. Cambios físico-químicos en manzanas Granny Smith asociados a la impregnación a vacío. Aplicaciones en congelación [Doctoral Thesis]. [Valencia, España]: Universidad Politécnica de Valencia; 1998. 296p.
46. Mohsenin N. Physical properties of plant and animal materials: structure, physical, characteristics and mechanical properties. New York: Gordon and Breach Science Publishers; 1986. 368p.
47. Silaa D, Duvettera T, Roecka A, Verlenta I, Smouta S, Moatesb G. Texture changes of processed fruits and vegetables: potential use of high-pressure processing. Trends Food Sci Tech. 2008 Jun; 19 (6): 309-319.
48. Rodríguez M. Estudio de la conservación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) utilizando los métodos de atmósfera modificada, refrigeración y enserado [Dissertation]. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2003. 103p.
49. Mora R, Peña A, López E, Ayala J, Ponce D. Agrofenología de *Physalis peruviana* L. en invernadero y fertirriego. Revista Chapingo Serie Horticultura. 2006; 12: 57-63.
50. Smout Ch, Sila DN, Vu TS, Van Loey AML, Marc EG, Hendrickx MEG. Effect of preheating and calcium pre-treatment on pectin structure and thermal texture degradation: a case study on carrots. J Food Eng. 2005; 67 (4): 419 - 425
51. Pinheiroa SCF, Almeidaa DPF. Modulation of tomato pericarp firmness through pH and calcium: Implications for the texture of fresh-cut fruit. Postharvest Biol Tech. 2009; 47 (1): 119-125
52. Castelló ML, Igual M, Fito PJ, Chiralt A. Influence of osmotic dehydration on texture, respiration and microbial stability of apple slices (Var. Granny Smith). J Food Eng. 2009; 91 (1): 1-9.
53. Fito P, Andrés A, Chiralt A, Pardo P. Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food-liquid systems. J Food Eng. 1996; 27 (3): 229-240.
54. Pinto L, Cortés M, Giraldo G. Evaluación del color durante el almacenamiento de la pulpa de banano verde impregnada al vacío con soluciones antipardeantes. Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011; 9 (2): 8-22.
55. Martelo Y, Cortes R, Suarez H. Desarrollo de apio mínimamente procesado fortificado con vitamina E, utilizando la ingeniería de matrices. Revista de la Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 2011; 165 (78): 28- 39.
56. Marín Z, Cortés M, Montoya O. Frutos de Uchuva (*Physalis peruviana* L.) Ecotipo 'Colombia' Mínimamente Procesados, Adicionados con Microorganismos Probióticos Utilizando la Ingeniería de Matrices. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 2010; 63 (1): 5395-5407.
57. Puente L, Betoret N, Cortés M. Evolution of probiotic content and color of apples impregnated with lactic acid bacteria. Vitae. 2009 Sep-Dec; 16 (3): 297-303.
58. Cortés M, Chiralt A. Cinética de los cambios de color en manzana deshidratada por aire fortificada con vitamina E. Vitae. 2008 Ene-Abr; 15 (1): 8-16.
59. Marín Z. Viabilidad de desarrollo de productos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesados con características probióticas a partir de la ingeniería de matrices [Master Thesis]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2009. 152p.
60. Restrepo A, Cortés M, Suárez H. Evaluación sensorial de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) y uchuva (*Physalis peruviana* L.) fortificada con vitamina E. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 2009; 61 (2): 2267-2275.
61. Marín Z, Cortés M, Montoya O. Evaluación sensorial de uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo Colombia inoculada con la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393. Vitae. 2010 Ene-Abr; 17 (1): 21-28.
62. Mazorra M, Quintana A, Miranda D, Fischer G, Chaves B. Análisis sobre el desarrollo y la madurez fisiológica del fruto de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en la zona de Sumapaz (Cundinamarca). Agronomía Colombiana. 2003; 21 (3): 175-189.
63. Ávila J, Moreno P, Fischer G, Miranda D. Influencia de la madurez del fruto y del secado del cáliz en uchuva (*Physalis peruviana* L.), almacenada a 18°C. Acta Agronómica. 2006; 55 (4): 29-38.
64. Manjarres J. Aprovechamiento de la corteza de naranja (*Citrus sinensis*) para el desarrollo de productos con valor agregado [Master Thesis]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2012. 78p.

# EFFECTIVIDAD Y SEGURIDAD DEL ESQUEMA GENÉRICO LAMIVUDINA/ZIDOVUDINA/EFAVIRENZ EN PACIENTES VIH (+). ESTUDIO FASE IV Y COMPARACIÓN CON EL MISMO ESQUEMA DE MEDICAMENTOS INNOVADORES

EFFECTIVENESS AND SAFETY OF GENERIC LAMIVUDINE/ZIDOVUDINE/EFAVIRENZ IN HIV (+) PATIENTS. PHASE IV STUDY AND COMPARISON WITH GENERIC AND INNOVATOR DRUGS

Francisco J. GUTIÉRREZ H. M.D., M.Sc.<sup>1,2</sup>, Pedro AMARILES Ph.D.<sup>1,3\*</sup>, Jaime GALINDO Esp.Med.Int.<sup>2</sup>, Héctor F. MUESES M. M.Sc.<sup>2</sup>, Juan F. AGUDELO A. QF<sup>1,2</sup>, Jaime A. HINCAPIÉ M.Sc.<sup>1</sup>

Recibido: Diciembre 13 de 2012 Aceptado: Marzo 19 de 2013

## RESUMEN

**Antecedentes:** El fortalecimiento de la política de productos competidores (genéricos) se puede acompañar de interrogantes sobre la calidad y, por tanto, sobre la efectividad de algunos de estos medicamentos. Los estudios fase IV son una opción válida para valorar la efectividad y seguridad de estos medicamentos. **Objetivos:** Valorar la efectividad y seguridad del esquema genérico Lamivudina/Zidovudina/Efavirenz en pacientes con VIH/SIDA que no han recibido terapia antirretroviral, que son atendidos en un programa de atención integral ambulatoria especializada, y comparar estos resultados con los datos de eficacia y seguridad reportados en un estudio de referencia (que utiliza el mismo esquema de medicamentos innovadores y fue realizado con pacientes con condiciones similares). **Métodos:** Se realizó un estudio clínico abierto no controlado del tipo fase IV. Se valoró la efectividad (disminución de carga viral en plasma y aumento de linfocitos CD4+) y seguridad (reacciones adversas) del esquema genérico Lamivudina/Zidovudina/Efavirenz durante 12 meses en pacientes mayores de 18 años VIH (+), que no habían recibido terapia antirretroviral y con indicación para recibirla. Los seguimientos clínicos y el seguimiento farmacoterapéutico fueron utilizados como estrategias de valoración y recolección de datos. Los resultados fueron comparados con los resultados reportados en un estudio referencia, contrastando la hipótesis de no inferioridad de dichos resultados. **Resultados:** El estudio incluyó 47 pacientes, de los cuales 33 estuvieron presentes hasta el final del estudio. Al año de tratamiento, en 28 pacientes (el 85%) la carga viral (valorada por indetectabilidad de las copias de RNAm viral/mL) alcanzó una disminución estadísticamente significativa, mientras que en 30 pacientes (el 91%) el recuento de linfocitos T-CD4+ mayor a 200 células/mm<sup>3</sup> alcanzó un aumento progresivo y estadísticamente significativo. Para la comparación se halló un artículo que cumplió con los criterios definidos y se contrastó la hipótesis de no inferioridad. En comparación con el estudio referencia, las proporciones de pacientes [intervalo de confianza del 95%] que lograron indetectabilidad no fueron estadísticamente diferentes: 0,85 [0,69-0,93] versus 0,90 [0,81-

<sup>1</sup> Grupo de Investigación Promoción y Prevención Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Grupo Educación y Salud en VIH/SIDA. Corporación de Lucha Contra el SIDA. Santiago de Cali, Colombia.

<sup>3</sup> Profesor Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A 1226. Medellín, Colombia. Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica. Universidad de Granada. Granada, España.

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: pamaris@farmacia.udea.edu.co

0,93],  $p = 0,7$ ; similarmente, no se encontró diferencias en el incremento promedio [desviación estándar] de linfocitos CD4+: 179 [142] versus 201 [21],  $p = 0,08$ . Tampoco se encontró diferencias notorias en el perfil de seguridad. **Conclusiones:** El esquema genérico evaluado, Lamivudina/Zidovudina/Efavirenz, muestra resultados de efectividad no inferiores a los reportados en un estudio de referencia diseñado para valorar el mismo esquema de medicamentos innovadores.

**Palabras clave:** VIH, fármacos anti-VIH, Seguimiento Farmacoterapéutico, medicamentos genéricos, estudio fase IV.

## ABSTRACT

**Background:** The strengthening of generic drugs policy may be accompanied by reservations about their quality, and therefore, also about effectiveness of some of these products. Phase IV clinical trials are a proper design to evaluate the effectiveness and safety of these drugs. **Objective:** Assess the effectiveness and the safety data of generic drug scheme Lamivudine/Zidovudine/Efavirenz in HIV (+) naïve patients who are served in a specialized comprehensive ambulatory care program, and compare these results with efficacy and safety data reported in reference studies (using the same therapeutic scheme of innovator drugs and conducted in patients with the same conditions). **Methods:** An open-label and non-controlled phase IV clinical trial was conducted. Effectiveness (measured as viral load reduction to undetectable level and lymphocytes CD4 + increase) and safety (adverse reactions) of the generic drug scheme Lamivudine/Zidovudine + Efavirenz were assessed. Antiretroviral therapy was used during 12 months in HIV (+) naïve patients over 18 years old who had the indication to treatment. Clinical follow-up and Pharmacotherapy follow-up were used as assessment strategies and data collection. Non-inferiority hypothesis was contrasted against the study results and those reported in a reference study. **Results:** The study included 47 patients, of which 33 completed the study. After one year of treatment, 28 patients (85%) achieved a statistically significant reduction in viral load (assessed by undetectable mRNA copies/mL), and 30 of them (91%) had a progressive and statistically significant increase in T- CD4 + lymphocyte count greater than 200 cells/mm<sup>3</sup>. The comparison was performed using an article that met the defined criteria, and non-inferiority hypothesis was proven. The proportions of patients [CI 95%] achieving undetectability was not statistically different when comparing with reference study: 0.85 [0.69 to 0.93] versus 0.90 [0.81 to 0.93],  $p = 0.7$ . Similarly, there was no difference in the average increase of CD4 + [SD]: 179 ± 142 versus 201 ± 21,  $p = 0.08$ . Likewise, No important differences in the safety profile were found. **Conclusions:** The generic drug scheme Lamivudine/Zidovudine/Efavirenz is effective and safe, and effectiveness outcomes achieved were not lower than those reported in reference studies designed to assess the same scheme of innovator drugs.

**Keywords:** HIV, anti-HIV agents, Pharmaceutical Care, generic drug, phase IV study.

## INTRODUCCIÓN

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y su consecuencia, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), constituye un problema complejo con implicaciones epidemiológicas, médicas, éticas, culturales y socioeconómicas que requiere de un abordaje integral y de la utilización racional del tratamiento antirretroviral (1). Por ello, es fundamental asegurar la disponibilidad y accesibilidad de antirretrovirales (ARV) efectivos, seguros, de calidad y al menor costo posible, objetivo en el que el desarrollo y fortalecimiento de la política de produc-

tos competidores (genéricos) se presenta como una opción válida (2). Sin embargo, esta política puede tener reparos sobre la calidad de algunos de estos medicamentos y, por tanto, de su eficacia clínica (3). La falta de efectividad de un tratamiento farmacológico puede tener origen en diversas causas, entre ellas la calidad de los medicamentos, asociada al fracaso terapéutico, a la persistencia de la sintomatología y, en especial, a las complicaciones de la enfermedad (4). En el caso de problemas de salud complejos y de alto costo, como el VIH/SIDA, esta situación puede causar una mayor morbi-mortalidad y un aumento en los costos de la atención de los pacientes por



consultas, tratamientos u hospitalizaciones adicionales (5). Por ello, se considera necesario generar información de los resultados clínicos alcanzados en los pacientes en las condiciones habituales de la práctica médica con los medicamentos genéricos, y compararlos con los resultados obtenidos con los medicamentos innovadores (6). Para ello, se puede realizar estudios clínicos fase IV, un tipo de estudios de utilización de medicamentos (EUM) en condiciones habituales de uso que permiten valorar la no inferioridad de los resultados alcanzados con respecto a los medicamentos innovadores (7). En dichos estudios el seguimiento farmacoterapéutico (SFT), acompañado de los seguimientos clínicos, puede ser una estrategia útil para recolectar y valorar de forma sistemática la información de los resultados de efectividad y seguridad de los medicamentos (8-10). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue valorar la efectividad y seguridad del esquema genérico Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz en pacientes con VIH/SIDA que no han recibido terapia antirretroviral, atendidos en un programa de atención integral ambulatoria especializada, y comparar estos resultados con los datos de eficacia y seguridad reportados en un estudio de referencia (que utiliza el mismo esquema de medicamentos innovadores y realizado en pacientes con condiciones similares).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

Estudio prospectivo fase IV tipo ensayo clínico abierto no controlado (estudio de utilización de medicamentos).

### Población

Pacientes mayores de 18 años VIH (+) invitados a participar y que firmaron el formato de consentimiento informado aprobado para la investigación, que no habían recibido terapia antirretroviral, pertenecientes a un programa de atención integral ambulatoria especializada en VIH/SIDA de la ciudad de Santiago de Cali, durante el periodo comprendido entre junio de 2009 y mayo de 2011.

### Muestra

Si se asume un fracaso terapéutico del 20% (11), para que se presenten 5 fracasos se necesitan como mínimo 27 pacientes que no han recibido terapia antirretroviral con indicación de tratamiento anti-

retroviral combinado (TARc) de primera línea en Colombia (EPI-info v.7 Stat Calc-Método de Fleiss para un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%). Por ello, se estimó que una muestra mínima hasta la terminación del estudio era de 27 pacientes.

### Muestreo

No probabilístico por cuotas en pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

### Unidad de Análisis

Resultados de los seguimientos clínicos y del SFT de pacientes que no han recibido terapia antirretroviral, hombres o mujeres mayores de 18 años infectados con el VIH que recibieron tratamiento con Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz, genéricos dentro del programa de atención integral ambulatoria especializada, durante el periodo comprendido entre junio de 2009 y mayo de 2011.

### Criterios de Inclusión

- Pacientes ambulatorios adultos (mayores de 18 años), pertenecientes a un programa de atención integral ambulatoria especializada, que aceptaron participar y firmaron el respectivo consentimiento informado.
- Pacientes diagnosticados como VIH (+) por pruebas de laboratorio: pruebas presuntivas y test confirmatorio, al igual que cifras de recuento de linfocitos T- CD4+ en células/mm<sup>3</sup> (por citometría de flujo) y valores de carga viral en plasma, medido en copias de RNAm del virus/mL (por reacción en cadena de la polimerasa-PCR- en tiempo real de la transcriptasa inversa).
- Pacientes con resultado del estudio genotípico de resistencias negativo, previo a la iniciación de tratamiento antirretroviral (analizado e interpretado bajo las recomendaciones internacionales actuales para el manejo de la infección por VIH) (12).
- Pacientes con indicación clínica y disposición a cumplir con el TARc de primera línea en Colombia y que aún no lo hubieran iniciado (según criterios de la institución donde se realizó el estudio y respaldados por las recomendaciones para el inicio de dicho tratamiento conforme a referentes internacionales).

### Criterios de Exclusión

- Pacientes con falla renal [creatinina sérica equivalente a una estimación del aclaramiento



- menor a los 60 mL/minuto, por la fórmula de Cockcroft–Gault (13)].
- Pacientes con falla hepática primaria o asociada con otra enfermedad.
  - Mujeres en período de gestación o lactancia.
  - Pacientes que estuvieran utilizando medicamentos con alta probabilidad de interacciones de relevancia clínica.
  - Presencia simultánea de anemia (Hemoglobina –Hb– inferior a 10g/dL).
  - Pacientes hospitalizados por complicaciones asociadas a la infección por VIH.
  - Pacientes con trastornos psiquiátricos mayores.

### Criterios de interrupción del tratamiento

- Pérdida de seguimiento (muerte, abandono del estudio por parte del paciente o retiro del paciente de la investigación y/o de la atención que brinda la institución).
- Incumplimiento del tratamiento por parte del paciente.
- Aparición de eventos adversos graves o serios.
- Aparición de alguno(s) de los criterios de exclusión y/o falta de cumplimiento con alguno(s) de los criterios de inclusión.

Se asignó a los pacientes el esquema genérico de tratamiento en estudio: Lamivudina/Zidovudina x 150/300 mg 1 comprimido cada 12 horas + Efavirenz x 600 mg 1 comprimido cada 24 horas (12, 14). Los pacientes fueron seguidos durante 12 meses, determinando al inicio, a los 3, 6 y 12 meses los valores de linfocitos CD4+ como un marcador de la inmunosupresión debida al VIH y, en los mismos períodos, la carga viral, como variables objetivas para evaluar la efectividad. Por su parte, para valorar la seguridad se realizó pruebas hepáticas (alanina aminotransferasa –ALT– y aspartato aminotransferasa –AST–), renales [creatinina sérica y estimación de la depuración de creatinina por la fórmula de Cockcroft–Gault (13)] y hematológicas (glóbulos rojos y recuento diferencial de glóbulos blancos, plaquetas, hemoglobina, hematocrito y citometrías).

### Seguimiento y recolección de datos

El seguimiento clínico fue realizado por los médicos de planta de la institución. Esta actividad se realizó antes de la toma de las muestras para las pruebas de laboratorio y después de conocer los resultados de las mismas. Adicionalmente, el paciente podía consultar en el momento que lo considerará

necesario. Todos los hallazgos fueron consignados en la historia clínica institucional. Por su parte, para el SFT se utilizó el método DÁDER (15), y fue realizado por un químico farmacéutico entrenado para ello durante 3 meses.

El SFT inició con el consentimiento del paciente, luego se realizó la primera entrevista en la cual se obtuvo la mayor información útil desde la perspectiva farmacéutica, basada en su historia clínica. En esta primera entrevista se efectuó la primera dispensación, se adecuó el horario de toma de los medicamentos, se informó al paciente sobre los posibles efectos adversos que se pueden presentar y se elaboró el primer estado de situación (documento en que se registra la relación entre problemas de salud y medicamentos utilizados para su tratamiento, incluyendo el TARc). Se realizó seguimiento telefónico al iniciar la TARc (a la semanas 1 y 2, y al completar el primer mes de tratamiento). Además, se evaluó la adherencia utilizando un método indirecto y validado en pacientes con VIH (*Simplified Medication Adherence Questionnaire–SMAQ–*) (16). Posteriormente, se realizó cada mes la dispensación de las dosis de tratamiento para el mismo periodo, la cual se acompañó de la elaboración del respectivo estado de situación, así como la realización de intervenciones cuando fuera necesario, orientadas a la prevención, mantenimiento o modificación de los estilos de vida que pudieran influir desfavorablemente en el control de la enfermedad (alcoholismo, drogadicción, entre otras), y en especial, la adherencia terapéutica.

### Variables de estudio

#### *Efectividad*

Determinada por el aumento significativo en los recuentos de CD4+ y por la disminución significativa de carga viral en plasma, medidos en la línea base previa al inicio del tratamiento, a los 3, 6 y 12 meses después de iniciar el TARc.

#### *Seguridad*

Valorada por los resultados de controles médicos, farmacéuticos y psicológicos. Adicionalmente, se realizó valoración y seguimiento de pruebas hematológicas (glóbulos rojos y recuento diferencial de glóbulos blancos, plaquetas, hemoglobina, hematocrito y citometrías), hepáticas (aspartato y alanino aminotransferasa) y renales [creatinina sérica y estimación de la depuración de creatinina

por la fórmula de Cockcroft–Gault (13)], así como la ausencia de otros problemas de seguridad. Estas pruebas fueron tomadas en los mismos tiempos en que se tomaron las pruebas virológicas e inmunológicas (inicio, 3, 6 y 12 meses), exceptuando la hemoglobina y hematocrito, valoraciones que fueron repetidas a las 4 y 8 semanas, y a los 3, 6 y 12 meses de iniciado el tratamiento.

### *Adherencia*

Establecida mediante el cuestionario SMAQ a partir de preguntas como: ¿el paciente ha olvidado tomar los medicamentos?, ¿el paciente toma los medicamentos a la hora indicada?, ¿el paciente deja de tomar los medicamentos cuando se siente mal?, o ¿el paciente olvidó tomar los medicamentos durante el fin de semana?, acompañado de una pregunta semicuantitativa (orientada a establecer el número de dosis no tomadas durante la última semana). La clasificación del paciente como adherente está dada por el criterio: cumple con un 95% o más de las dosis indicadas; y no adherente: cumplimiento menor al 95%.

Para minimizar posibles sesgos de análisis se utilizó las siguientes estrategias: en las determinaciones del recuento de linfocitos CD4+, de los niveles de carga viral y demás variables de interés, las muestras sanguíneas fueron tomadas en las mismas condiciones, usando los mismos equipos para los análisis y utilizando técnicas analíticas validadas para ello en el laboratorio habitual de referencia de la institución prestadora de la atención integral. Los medicamentos necesarios para los tratamientos durante el periodo del estudio fueron aportados por Humax Pharmaceutical S.A. (Medellín, Colombia), los cuales provenían del mismo lote de producción, con certificado de análisis de calidad respectivo y con pruebas de disolución que garantizaban su similitud con los medicamentos innovadores.

### **Grupo control para la comparación de la efectividad**

Con el fin de identificar un grupo control adecuado se realizó una revisión de la literatura biomédica para identificar publicaciones con resultados alcanzados en pacientes con condiciones similares y con el mismo esquema (dosis, frecuencia y tiempo de seguimiento) pero en tratamiento con medicamentos innovadores. En este sentido, se planteó una hipótesis de no inferioridad, para la cual fueron comparados los resultados obtenidos

con los reportados en una publicación de referencia que incluyó pacientes con condiciones similares a los del presente estudio y con el mismo esquema de tratamiento Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz, pero con medicamentos innovadores. Para la selección del estudio referencia (comparador) se utilizó los siguientes criterios: a) información de las características poblacionales al inicio; b) tiempo de seguimiento de un año; c) reporte de los datos completos de pacientes que lograron metas de tratamiento (carga viral indetectable y aumento promedio de CD4 +); d) posibilidad de inferir o asegurar que el esquema con el que se trató a los pacientes usó medicamentos innovadores; e) publicación en una revista científica con un alto factor de impacto y, por tanto, que garantizara la aplicación de las buenas prácticas clínicas en la realización del estudio.

### **Análisis estadístico**

Para determinar la distribución de cada variable se realizó estadísticos descriptivos y un test de distribución normal. Posteriormente, las características iniciales de la cohorte seguidas de las mediciones clínicas posteriores fueron comparadas mediante test de rango con *signo de Wilcoxon* para proporciones o porcentajes, y pruebas *t-Student* o *ANOVA* de mediciones repetidas para variables continuas. Los análisis fueron realizados utilizando el programa SPSS versión 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Ili). La contrastación de la hipótesis de no inferioridad con los datos reportados en la literatura fue realizada a través de métodos de inferencia sobre parámetros, realizando pruebas de significancia por comparación de medias o de proporciones para dos poblaciones independientes. La comparación se apoyó en la herramienta EPIDAT 3,1 (OPS/OMS). Valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

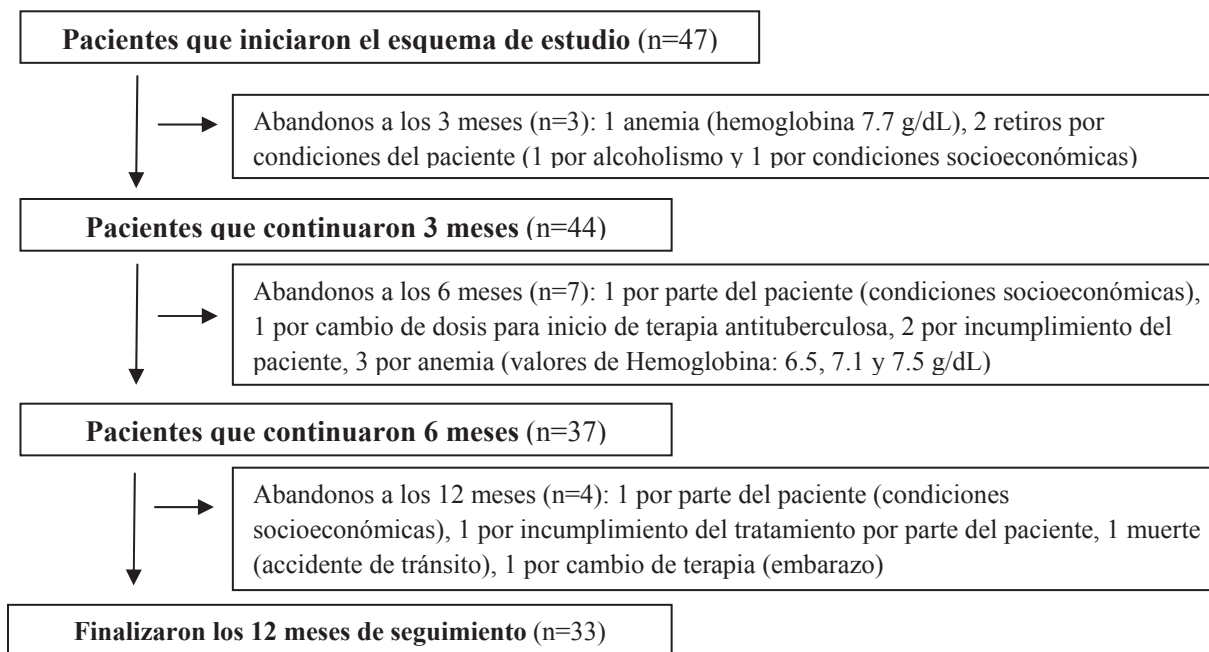
### **Consideraciones éticas**

Este proyecto de investigación se ajustó a las normas de ética médica vigentes (17). En Colombia se acogió a lo dispuesto en la Resolución 8430 de 1993 y la Resolución 2378 de 2008, Declaración de Helsinki y sus enmiendas, y la Guía de las Buenas Prácticas Clínicas (ICH E6); en consecuencia, el estudio fue aprobado por el Comité Técnico de Investigaciones de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia y por el Comité de Ética para Investigación en Humanos de la institución donde se ejecutó el proyecto.

## RESULTADOS

Se invitó a 59 pacientes a participar, de los cuales 47 cumplieron criterios de inclusión, el flujo de los pacientes en el estudio se presenta en la figura 1. En los 47 pacientes que cumplieron criterios de inclusión, la edad media (con desviación estándar [DE]), fue 34,4 años [10,4], y 38 (80,9%) eran hombres. De estos 47 pacientes, 33 (70,2%)

cumplieron con el tratamiento durante los doce meses de seguimiento. Por su parte, de las 14 discontinuaciones del tratamiento, 4 (28,6%) fueron atribuibles a problemas de seguridad relacionadas con el esquema de tratamiento: posible anemia grave (valores de hemoglobina de 6,5, 7,1, 7,5 y 7,7 g/dL) por Zidovudina. En la tabla 1 se presenta las características sociodemográficas de los 33 pacientes que finalizaron el estudio.



**Figura 1.** Flujo de los pacientes en el estudio.

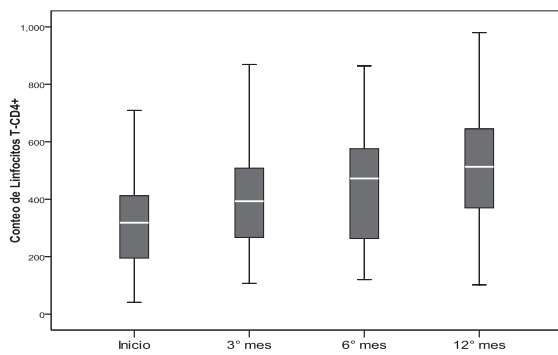
**Tabla 1.** Características socio demográficas de los 33 pacientes que completaron 12 meses de seguimiento.

VARIABLES	Media	Desviación estándar
Edad	34,7	10,6
Edad en hombres	34,1	10,9
Edad en mujeres	37,8	8,8
VARIABLES	Frecuencia	Porcentaje
Género		
Masculino	28	84,8
Femenino	5	15,2
Ocupación		
Empleado	14	42,4
Independiente	12	36,4
Estudio	3	9,1
Hogar	2	6,1
Desempleado	2	6,1

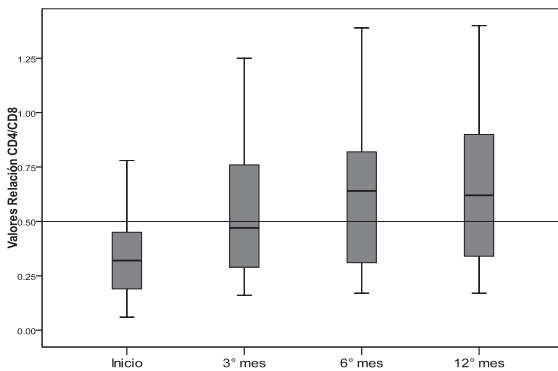
De los 33 pacientes que completaron los doce meses de seguimiento, 23 (69,7%) fueron diagnosticados en estado no avanzado de enfermedad (18). Por su parte, relacionado con los objetivos del estudio, de los 33 pacientes un total de 28 (84,8%) alcanzaron una carga viral indetectable, significativamente diferente al valor inicial del tratamiento ( $p < 0,001$ ), y 30 (90,9%) presentaron un aumento progresivo y significativo del recuento de células T CD4+ por encima de 200 células/mm<sup>3</sup> ( $p < 0,001$ ). Adicionalmente, se observó un incremento promedio mayor de 0,5 en la relación CD4/CD8 (ver figuras 2-4).



**Figura 2.** Número promedio de la carga viral en copias/mL en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio.

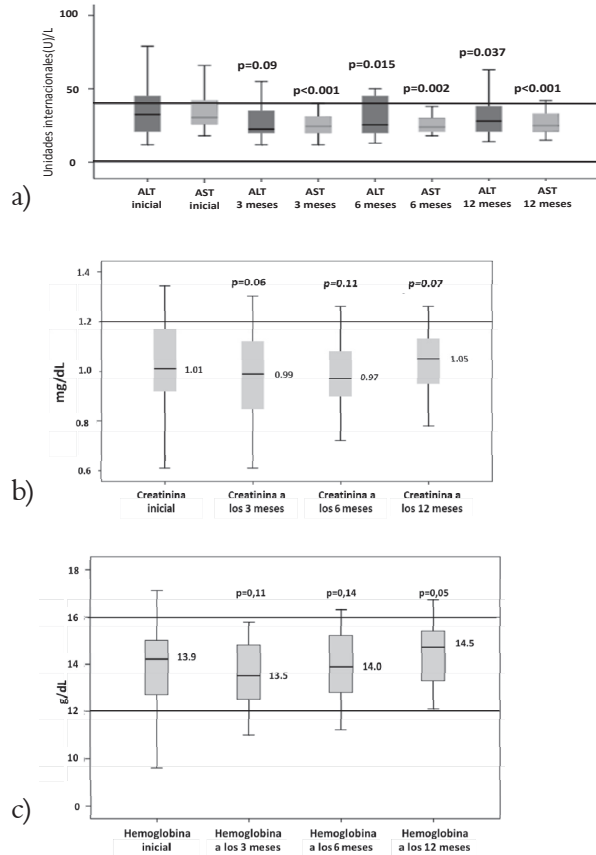


**Figura 3.** Distribución de células T-CD4+ en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio.



**Figura 4.** Distribución de la relación células T-CD4+/CD8 en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio.

La evolución de resultados de transaminasas, creatinina y hemoglobina en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio se presenta en la figura 5. En el caso de las transaminasas (AST y ALT) se presentó disminuciones estadísticamente significativas en cada período de observación (3, 6 y 12 meses) (ver figura 5-A).



**Figura 5.** Evolución de resultados de transaminasas, creatinina y hemoglobina en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio. a) Evolución de los niveles de alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio\*; b) Evolución de los niveles creatinina sérica en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio\*; c) Evolución de los niveles de hemoglobina en los 33 pacientes durante los 12 meses del estudio\*.

\*Valores de p para la comparación entre el resultado para cada periodo y la medición basal.

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) presentadas por la totalidad de los 47 pacientes incluidos en el estudio, fueron transitorias y detectadas en el SFT (ver tabla 3). Además, se presentó 45 problemas de proceso con los medicamentos, especialmente la adherencia menor al 95%, los cuales, exceptuando dos casos en los que fue necesario excluir los pacientes, fueron identificados, intervenidos y resueltos mediante el SFT.

**Tabla 3.** Eventos adversos evidenciados en los pacientes del estudio (N = 47).

Eventos adversos	Frecuencia (%)
Somnolencia	16 (34,0)
Marco	15 (31,9)
Nauseas	9 (19,1)
Fatiga	9 (19,1)
Anemia (Hb inferior a los 10g/dL)	5 (10,6)*
Síntomas dispépticos	7 (14,9)
Sensación de calor o fogaje	6 (12,8)
Rash generalizado transitorio	5 (10,6)
Vómito	4 (8,5)
Pesadillas	4 (8,5)
Insomnio	2 (4,2)
Disminución del apetito	1 (2,1)
Hiperpigmentación transitoria de las uñas	1 (2,1)

\* De ellas, cuatro causaron la discontinuación del tratamiento, debido a valores de hemoglobina (Hb) iguales o inferiores a 7.7g/dL.

### Comparación con estudios de referencia

La selección de un estudio para la comparación dio como resultado el trabajo publicado por Staszewski *et al.*, 1999 (19). A continuación se presenta los resultados de las comparaciones en las variables de efectividad:

#### Valores iniciales

No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre la población en estudio con el esquema genérico Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz con respecto a la población de estudio de referencia con medicamentos innovadores, en lo que tiene que ver con género, edad, recuento de células T CD4+ y carga viral (ver tabla 4).

**Tabla 4.** Comparación inicial de las poblaciones del estudio versus la referencia (19).

Variables	Estudio	Referencia (19)	Valor p
Proporción de hombres [IC 95%]	0,85 [0,69 - 0,93]	0,88 [0,82 - 0,92]	p = 0,87
Edad promedio en años [DE]	34,7 [10,6]	36,5 [8,4]	p = 0,29
Promedio T - CD4+ células/mm <sup>3</sup> [DE]	318,8 [181,1]	350,0 [190]	p = 0,37
Promedio Carga Viral - copias RNAm del virus/mL [DE]	153,024 [346,653]	60,256 [350,012]	p = 0,17

DE: desviación estándar. IC 95%: intervalo de confianza 95%.

### Valores finales

Después de aproximadamente un año de tratamiento (12 meses en el presente estudio y 48 semanas en el estudio control), la diferencia de medias (en los valores de células CD4+) y la diferencia de proporciones (de pacientes con carga viral indetectable) no fueron estadísticamente significativas, y por tanto se prueba la hipótesis de no inferioridad del esquema genérico. En las dos poblaciones, de estudio y de referencia, los resultados del seguimiento muestran diferencia estadísticamente significativa en el incremento de las células CD4+ y en la disminución de la carga viral a niveles de indetectabilidad cuando se comparan los valores basales con los resultados finales en cada uno de los estudios. Las comparaciones se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Comparación de los desenlaces virológicos e inmunológicos en las poblaciones del estudio versus la referencia (19).

Variables	Estudio	Referencia (19)	Valor p
Proporción de pacientes con carga viral indetectable [intervalo de confianza 95%]	0,85 [0,69 - 0,93]	0,90* [0,81 - 0,93]	0,7
Aumento promedio de CD4+ (células/mm <sup>3</sup> ) [Desviación estándar]	179 [142]	201 [21]	0,08

\* Indetectabilidad: reportada como valores inferiores a las 50 copias/mL.

## DISCUSIÓN

En este estudio el tratamiento con el esquema genérico Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz en pacientes con VIH/SIDA sin resistencias primarias o transmitidas, de un programa de atención integral ambulatoria especializada, no resultó inferior a los datos de eficacia reportados con el esquema innovador (Combivir® + Stocrin®, respectivamente) en condiciones similares (19). En este sentido, la comparación de la efectividad, determinada por los niveles alcanzados en la carga viral y en los recuentos de linfocitos CD4+, no presentó diferencias estadísticas significativas, comprobándose entonces la hipótesis de no inferioridad del esquema genérico respecto al estudio referencia. Adicionalmente, la comparación cualitativa del perfil de seguridad del esquema genérico (establecido por valoraciones rea-



lizadas mediante controles médicos, farmacéuticos, psicológicos, hematológicos, hepáticos y renales durante los 12 meses de seguimiento) con el reportado para el esquema innovador en diferentes estudios no muestra diferencias significativas, en especial con la anemia macrocítica asociada a Zidovudina (20-25).

Para la comparación se realizó una búsqueda bibliográfica en la cual se identificó un estudio que cumplió con los criterios de inclusión (pacientes con condiciones similares y con resultados de la combinación con medicamentos innovadores Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz), el cual, a pesar de haber sido publicado en 1999, es uno de los estudios que respaldó la recomendación de este esquema como tratamiento de primera línea (19). Además, se identificó otros trabajos, los cuales, aunque no cumplen con todos los criterios de inclusión, utilizan el esquema Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz con medicamentos innovadores, y reportan resultados de indetectabilidad en la carga viral cercanos al 85% alcanzado en el presente estudio. Por ejemplo, el estudio de Robbins *et al.*, 2003 (26) reportó una proporción de pacientes con carga viral indetectable del 75%. Similarmente, en el estudio de Gallant *et al.*, 2006 (27), diseñado con el objetivo de comparar un esquema basado en Tenofovir, Emtricitabina y Efavirenz versus el esquema Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz, reportó en el brazo de control (Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz) una proporción del 73% de los pacientes que lograron indetectabilidad de la carga viral. Por su parte, un estudio abierto con 19 pacientes con el esquema innovador *Combivir*<sup>®</sup> + *Stocrin*<sup>®</sup> realizado en Londres por Portsmouth S *et al.*, 2004 (20), encontró que el tiempo medio para alcanzar una carga viral indetectable fue de 12 semanas (rango 4-36 semanas); tiempo que es similar al que se obtuvo en el presente estudio (12 semanas) (ver figura 2).

En lo relacionado con la seguridad del TARc en este estudio los 5 casos de anemia asociada al tratamiento que se presentó en los 47 pacientes cursaron con macrocitosis, y su incidencia fue del 10,6%, valor que se encuentra en el límite inferior del rango (10-25%) establecido para este problema de seguridad a partir de varios estudios (20-25), y por consiguiente ligeramente inferior a varios de los reportes de cada estudio; por ejemplo, inferior al 19,4% del estudio de Rajesh *et al.*, 2011 (21), quienes identificaron 19 casos de anemia macrocítica en 98 pacientes en tratamiento con TARc y esquema de Zidovudina. Además, estos autores reportan,

gracias a un análisis de regresión logística, que los valores de hemoglobina inferiores a los 10,5 g/dL, al inicio del tratamiento, son un fuerte predictor para la aparición grave de este problema de seguridad. Por su parte, un estudio realizado en el estado de Paraná (Brasil) con 110 pacientes, con respecto a la posibilidad de desarrollar macrocitosis, encontró diferencias estadísticamente significativas en los grupos de pacientes utilizando esquemas de TARc con Zidovudina respecto a los pacientes con esquemas sin este fármaco (22). La anemia macrocítica grave o seria (Hb inferior a 6,5 g/dL) se presentó en uno (2,2%) de los pacientes incluidos; este valor es ligeramente inferior al 6,6% reportado, a las 48 semanas de tratamiento en pacientes VIH (+) que inician tratamiento con Zidovudina (23).

Los otros efectos adversos encontrados en el estudio son similares a los reportados en la literatura biomédica para los medicamentos de este esquema de TARc, y proporcionalmente similares a los del estudio de Portsmouth S *et al.*, 2004 (20). En este estudio, aunque las aminotransferasas (AST y ALT) presentaron valores ligeramente elevados al inicio del tratamiento, posteriormente, se presentó una disminución estadísticamente significativa en cada período de observación (3, 6 y 12 meses), lo cual puede ser reflejo de la disminución progresiva de la carga viral y del efecto pro-inflamatorio del virus (28).

La realización del SFT por parte de un Químico Farmacéutico puede ayudar a prevenir abandonos por los efectos adversos que pueden presentar los pacientes al inicio de la TARc; por tanto, el SFT podría haber afectado esta variable. En este sentido, aunque el diseño del estudio no permite generar conclusiones sobre el efecto del SFT, sí se puede inferir que dicho proceso fue una herramienta importante para evaluar la efectividad y seguridad de los medicamentos de la TARc y para gestionar el estudio.

En general, la información que arroja el presente estudio permite evaluar los resultados clínicos de los ARV competidores, lo cual es importante dada la modificación del proceso en la Food and Drug Administration para agilizar la revisión de ARV genéricos disponibles para el plan de emergencia para el manejo del SIDA (29). Similarmente, en los países en desarrollo (2), incluyendo Colombia, el impacto de la política de medicamentos genéricos de primera y segunda línea se ha visto reflejado en la disminución del costo del tratamiento y en un ma-

por acceso a estos productos (11). En definitiva, este estudio aunque no es novedoso, por su concepción y diseño (ensayo clínico abierto no controlado), coincide con información publicada y aporta elementos importantes para la valoración terapéutica de los ARV genéricos producidos en Colombia, los cuales son una opción siempre y cuando se trabaje simultáneamente sobre la adherencia de los pacientes y la optimización del tratamiento. En este sentido, es importante destacar que el esquema Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz es uno de los esquemas más utilizados en Colombia, incluyendo la institución en la que se realizó el estudio. Adicionalmente, un estudio de uso de medicamentos en condiciones normales de la práctica médica realizado por Gutiérrez *et al.*, 2007 (11), en una entidad promotora de salud (Medellín, Colombia), en el cual se incluyeron en el análisis a 670 pacientes en TARc, reportó que un 57% de los pacientes estaba en tratamiento con el esquema Lamivudina/Zidovudina + Efavirenz, siendo el primero y único esquema recibido, con niveles de indetectabilidad de la carga viral (carga viral <400 copias/mL) cercanos al 83%.

Las limitaciones del presente estudio son atribuibles a su diseño, debido a que no se realizó un estudio controlado, y la comparación de los resultados obtenidos se realizó con resultados tomados de la literatura científica, que corresponden a pacientes de poblaciones diferentes a los evaluados, por lo tanto se limita la posibilidad de generalizar los hallazgos.

## CONCLUSIONES

Al año de tratamiento de pacientes VIH que no han recibido terapia antirretroviral, los resultados de efectividad alcanzados con el esquema genérico Lamivudina/Zidovudina+Efavirenz no son inferiores a los alcanzados en un grupo de pacientes con condiciones clínicas similares tratados bajo el mismo esquema con medicamentos innovadores.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Humax Pharmaceutical S.A. (Medellín, Colombia) por su apoyo para la realización de este trabajo. El grupo de investigación Promoción y Prevención farmacéutica recibe fondos de la Convocatoria de Estrategia de Sostenibilidad 2013-2014 de la Universidad de Antioquia.

**Conflicto de intereses:** Trabajo patrocinado por Humax Pharmaceutical S.A. (Medellín, Colombia). Francisco J. Gutiérrez H. y Jaime A. Hincapié, son empleados de Humax Pharmaceutical S.A.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA [en línea]. Ginebra (Suiza); 2007 Dec; [accesado Agosto 2012]. Disponible en: [http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007\\_epiupdate\\_es.pdf](http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007_epiupdate_es.pdf).
2. Waning B, Diedrichsen E, Moon S. A lifeline to treatment: the role of Indian generic manufacturers in supplying antiretroviral medicines to developing countries. *J Int AIDS Soc.* 2010 Sep 14; 13: 35.
3. Kumet R, Gelenberg AJ. The effectiveness of generic agents in psychopharmacologic treatment. *Essent Psychopharmacol.* 2005; 6 (2): 104-111.
4. Rheinstein PH. Therapeutic inequivalence. *Drug Saf.* 1990; 5 (S1): 114-119.
5. Over M, Revenga A, Masaki E, Peerapatanapokin W, Gold J, Tangcharoensathien V, et al. The economics of effective AIDS treatment in Thailand. *AIDS.* 2007 Jul; 21 (S4): S105-S116.
6. Oluboka O, Stewart S, Landry S, Adams S. Does therapeutic equivalence follow bioequivalence? A randomized trial to assess clinical effects after switching from Clozaril to generic clozapine (gen-clozapine). *J Clin Pharmacol.* 2010 May; 50 (5): 531-535.
7. Amariles P, Muñoz A, Restrepo M, Villegas A. Eficacia Clínica de la Glicazida Genérica con respecto al medicamento referencia en el tratamiento de la diabetes tipo 2 en afiliados al ISS. *Medellin-Colombia 1999. Pharmaceutical Care (Esp).* 2001; 3 (5): 370-390.
8. Grissinger M. Eficacia Clínica de la Glicazida Genérica con respecto al medicamento referencia en el tratamiento de la diabetes tipo 2 en afiliados al ISS. *Medellin-Colombia 1999. 2006;* 31(11): 635-636.
9. Amariles P, Faus MJ, Sabater D, Machuca M, Martínez-Martínez F. Seguimiento Farmacoterapéutico y parámetros de efectividad y seguridad de la farmacoterapia. *El farmacéutico.* 2006; 362: 84-100.
10. Amariles P. Seguimiento Farmacoterapéutico en pacientes VIH/SIDA. *Aula de Farmacia.* 2011; 7 (87): 8-24.
11. Gutiérrez F, Velásquez C, Amariles P, Giraldo N, Ocampo S, Estrada J. Impacto del Seguimiento Farmacoterapéutico en un Programa de VIH/SIDA de la Ciudad de Medellín, 2005-2007. *Infectio.* 2008; 12 (S1): 124.
12. WHO. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings. Guidelines for a public health approach. Geneva: WHO; 2002.
13. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron.* 1976; 16 (1): 31-41.
14. AIDSINFO-NIH. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents [internet]. NIH; 2011. [citado agosto 2012]. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>
15. Sabater Hernández D, Silva Castro MM, Faus MJ. Método Dáder: Guía de Seguimiento Farmacoterapéutico. Tercera Edición. Granada (España): Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica; 2007.
16. Knobel H, Escobar I, Polo R, Ortega L, Martín-Conde MT, Casado JL, et al. Recomendaciones GESIDA/SEFH/PNS para mejorar la adherencia al tratamiento antirretroviral (2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005 Apr; 23 (4): 221-231.
17. Sarria-Castro M. Bioética, investigación y salud pública, desde una perspectiva social. *Rev Cubana Salud Pública.* 2007 Ene-Mar; 33 (1).
18. CDC. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among

- Adolescents and Adults. *MMWR Recomm Rep.* 1992; 41 (RR-17): 1-19.
19. Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med.* 1999 Dec 16; 341 (25): 1865-1873.
  20. Portsmouth S, Imami N, Pires A, Stebbing J, Hand J, Nelson M, et al. Treatment of primary HIV-1 infection with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based therapy is effective and well tolerated. *HIV Medicine.* 2004 Jan; 5 (1): 26-29.
  21. Rajesh R, Vidyasagar S, Varma DM, Mohiuddin S, Noorunnisa. Evaluation of incidence of zidovudine induced anemia in Indian human immunodeficiency virus positive patients in comparison with stavudine based highly active antiretroviral therapy. *Int J Risk Saf Med.* 2011; 23 (3): 171-180.
  22. Antunes de Oliveira O, Antunes de Souza R, Do Rosário L. Impacto do tratamento antirretroviral na ocorrência de macrocitose em pacientes com HIV/AIDS do município de Maringá, Estado do Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Jan-Feb; 44 (1): 35-39.
  23. Ssali F, Stöhr W, Munderi P, Reid A, Walker AS, Gibb DM, et al. Prevalence, incidence and predictors of severe anaemia with zidovudine-containing regimens in African adults with HIV infection within the DART trial. *Antivir Ther.* 2006; 11 (6): 741-749.
  24. Zhou J, Jaquet A, Bissagnene E, Musick B, Wools-Kaloustian K, Maxwell N, et al. Short-term risk of anaemia following initiation of combination antiretroviral treatment in HIV-infected patients in countries in sub-Saharan Africa, Asia-Pacific, and central and South America. *J Int AIDS Soc.* 2012 Jan 30; 15 (1) : 5.
  25. Severe P, Juste MA, Ambroise A, Eliacin L, Marchand C, Apollon S, et al. Early versus Standard Antiretroviral Therapy for HIV-Infected Adults in Haiti. *N Engl J Med.* 2010; 363 (3): 257-265.
  26. Robbins GK, De Gruttola V, Shafer RW, Smeaton LM, Snyder SW, Pettinelli C, et al. Comparison of sequential three-drug regimens as initial therapy for HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11; 349 (24): 2293-2303.
  27. Gallant JE, De Jesus E, Arribas JR, Pozniak AL, Gazzard B, Campo RE, et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N Engl J Med.* 2006 Jan 19; 354 (3): 251-260.
  28. Mata-Marín JA, Gaytán-Martínez J, Grados-Chavarría BH, Fuentes-Allen JL, Arroyo-Anduiza CI, Alfaro-Mejía A. Correlation between HIV viral load and aminotransferases as liver damage markers in HIV infected naive patients: a concordance cross-sectional study. *Viol J.* 2009 Oct 30; 6 (10): 181.
  29. Holmes Ch, Coggin W, Jamieson D, et al. Use of generic antiretroviral agents and cost savings in PEPFAR treatment programs. *JAMA.* 2010 Jul 21; 304 (3): 313-320.

# CHEMICAL COMPOSITION AND ANTI-IRRITANT CAPACITY OF WHOLE BODY EXTRACTS OF *Ulomoides dermestoides* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE)

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTI-IRRITANTE DE EXTRACTOS DE CUERPO ENTERO DE *Ulomoides dermestoides* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE)

Dary L. MENDOZA M.<sup>1\*</sup>, Stephanie SAAVEDRA A.<sup>2</sup>

Received: 23 July 2012 Accepted: 10 April 2013

## ABSTRACT

**Background:** In traditional medicine of Central and South America, the tenebrionid beetle *Ulomoides dermestoides* is used as an aphrodisiac, for the treatment of inflammatory diseases and cancer. Recently was reported cytotoxic and genotoxic properties of non-polar extract of *U. dermestoides*; also anti-inflammatory and immunomodulatory activity of aqueous whole body extract of beetle was reported, it suggests the existence of components with potential pharmacology use. On the other hand, it is necessary to identify those polar and non-polar extracts of *U. dermestoides* with anti-irritant properties for the membranes and blood vessels, which will be used in subsequence biological test and clinical assays. **Objectives:** The purpose of this research was to identify the chemical composition of methanolic and hexanic extracts of *U. dermestoides*, and to assess their anti-irritant capacity. **Methods:** The extracts were obtained from adult beetles of *U. dermestoides*. The chemical composition of the extracts was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and the anti-irritant effect of each extract was evaluated by means of a modified assay of irritation of the chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized chicken eggs (HET-CAM); the results were expressed as irritation index (IR). **Results:** Six common compounds were identified in both extracts: limonene, myristic, palmitic, stearic, oleic, and linoleic fatty acids. But in the alone methanolic extract were found: 1-pentadecanol, alpha-pinene, beta-phellandrene and alpha-terpinene, whereas in the hexanic extract were found: 2-methyl-p-benzoquinone, 2,4-dihidroxy-1-ethylbenzene, 2,5-dimethyl-quinone, saturated and unsaturated hydrocarbons and alcohols. The methanolic extract of *U. dermestoides* showed potential anti-irritant effect in the HET-CAM test ( $IR = 3.09 \pm 0.11$ ), similar to that observed with Nimesulida ( $IR = 2.05 \pm 0.14$ ), a non-steroid anti-inflammatory drug (NSAID) used as positive control for irritation inhibition reaction. The hexanic extract did not show anti-irritant capacity. **Conclusions:** The results demonstrated the anti-irritant effect of the methanolic extracts of *U. dermestoides* that could be attributed to compounds with anti-inflammatory activity as oleic acid and limonene. **Keywords:** *Ulomoides dermestoides*, beetles, metabolites, biological assay, Chorioallantoic Membrane.

<sup>1</sup> Programa de Química. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad del Atlántico. Barranquilla, Colombia.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Básicas. Universidad del Atlántico. Km. 7 antigua carretera a Puerto Colombia. Barranquilla, Colombia.

\* Corresponding autor: dary\_mendoza@yahoo.com

## RESUMEN

**Antecedentes:** En medicina tradicional de Centro y Sur América, el escarabajo tenebrionido *Ulomoides dermestoides* es usado como afrodisíaco, en tratamiento de enfermedades inflamatorias y cáncer. Recientemente se reportó las propiedades citotóxicas y genotóxicas de un extracto no polar de *U. dermestoides*; también la actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de un extracto acuoso del cuerpo entero del coleóptero, lo cual sugiere la presencia de compuestos con potencial uso farmacológico. Adicionalmente, se requiere identificar extractos polares y no polares del *U. dermestoides* con propiedades anti-irritantes para las membranas y vasos sanguíneos, los cuales serían usados en subsiguientes ensayos biológicos y en pruebas clínicas. **Objetivos:** El propósito de esta investigación fue determinar la composición química de extractos metanólicos y hexánicos del cuerpo entero de *U. dermestoides*, y evaluar su capacidad anti-irritante. **Métodos:** Los extractos fueron obtenidos de coleópteros adultos de *U. dermestoides*. La composición química de los extractos fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y el efecto anti-irritante fue evaluado mediante ensayo modificado de irritación de la membrana corioalantoidea (CAM) de huevos fertilizados de gallina (HET-CAM); los resultados fueron expresados como índice de irritación (IR). **Resultados:** Se identificó 6 compuestos comunes en ambos extractos: limoneno, los ácidos grasos mirístico, palmítico, esteárico, oleico y linoleico. En el extracto metanólico también se encontró: 1-pentadecanol, alfa-pineno, beta-felandreno y alfa-terpineno; en el extracto hexánico: 2-metil-p-benzoquinona, 2,4-dihidroxi-1-etilbenzeno, 2,5-dimetil-quinona, hidrocarburos saturados e insaturados y alcoholes. El extracto metanólico mostró efecto anti-irritante potencial en el ensayo HET-CAM (IR =  $3,09 \pm 0,11$ ), similar al observado con el fármaco Nimesulida (IR =  $2,05 \pm 0,14$ ), un anti-inflamatorio no esteroide (AINES) usado como control positivo de la inhibición de la irritación. El extracto hexánico no mostró capacidad anti-irritante. **Conclusiones:** Los resultados demostraron el efecto anti-irritante de los extractos metanólicos de *U. dermestoides*, lo que podría atribuirse a compuestos con actividad anti-inflamatoria como el ácido oleico y el limoneno.

**Palabras clave:** *Ulomoides dermestoides*, escarabajos, metabolitos, bioensayo, membrana corioalantóide.

## INTRODUCTION

*Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1893) (synonyms: *Martianers dermestoides*; *Palembus dermestoides*), is an Asian tenebrionid beetle commonly known as the "peanut beetle" because it is a pest to peanuts and other grains (1). The beetles are eaten alive as an aphrodisiac in Southeast Asia (2, 3). In Central and South America it is used in the treatment of various illnesses such as bronchial asthma, dermatitis, rheumatoid arthritis, hemorrhoids, inflammations and pain in the liver and kidneys, Parkinson disease, diabetes mellitus, and different types of cancer (4-7).

Although the use of beetles in folk medicine is spread, few studies have been published about the insect compounds responsible for the potential healing effects. A recent publication has described the cytotoxic and genotoxic properties of *U. dermestoides* benzoquinone (1, 4-benzoquinones) on human lung carcinoma epithelial cell line A549; similar results were reported with the dichloromethane whole body extract, which could explain the positive results reported in alternative treatments for

cancer (8). Another publication has reported the anti-inflammatory properties of polar whole body extract of *U. dermestoides* using carrageenan-induced paw edema assay in rats and human peripheral blood mononuclear cells (9); however, the specific anti-inflammatory compounds in this extract are unknown.

In addition, an in vitro study about crude extracts of the defense secretion of beetle *Palembus ocularis* reported inhibitory activity of the enzyme 5-lipoxygenase, suggesting a possible bronchodilator effect of these beetles, the same study showed anti-inflammatory effect from a polar extracts of defense secretion and their major compound, hydroquinone, using a modified in vivo test on the chorioallantoic membrane of the fertilized hen's egg (HET-CAM), which suggests that hydroquinone in the defense secretion of beetles have anti-inflammatory properties (10).

HET-CAM test is a current method that allows determining anti-inflammatory activity and toxic effects of complex extracts, and has proven be useful



in screening natural products (11). Irritation causes alterations in the vascular system of the CAM that result in membrane discoloration, hemorrhaging and increased perfusion. In the HET-CAM test the anti-inflammatory activity occurred when irritation of the CAM, induced by an irritant agent, decreased and the blood vessel net appeared unchangeable (12, 13).

In this study we have analyzed the chemical composition of the methanolic and hexanic extracts of *U. dermestoides* and have determined their potential anti-irritant effect using HET-CAM test.

## MATERIALS AND METHODS

### Extracts

Specimens of *Ulomoides dermestoides* were identified in the Entomology Department of the Natural Sciences Institute (Universidad Nacional, Bogotá, Colombia, collection code ICN-45905). The specimens were kept protected from light and under controlled conditions for temperature ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and relative humidity (70-75%) and were only fed with wheat bran and whole-grain bread. Extracts were prepared from 2 g of adult beetles obtained from the culture and frozen at  $-70^\circ\text{C}$ . To obtain methanolic extract, the protocol in Unruh *et al.*, 1998 (14), was followed with modifications. Briefly, beetles were crushed using traditional friction fragmentation methods with a mortar under a current of liquid nitrogen, followed by extraction with 25 mL of methanolic solution (methanol 10% v/v, HCl 10mM and ascorbic acid 25 mM). Hexanic extract was obtained from fragmented beetles using 25 mL of hexane during 12 hours and under constant stirring. Both extracts were clarified by using centrifugal force at  $3500 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$  in a Beckman 81783 GS 6R centrifuge, and filtered through fiberglass membranes. All extracts were kept sealed and frozen until they were used.

### GC-MS

Simultaneous extraction and concentration were done to the compounds found in the vapor phase of the methanolic extract by using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). A 65- $\mu\text{m}$  PDMS/DVB fiber was used, and split injection was conducted using the mode with a volume of injection of  $1 \mu\text{L}$ . The hexanic extract ( $1 \mu\text{L}$ ) was injected manually. Chromatographic analysis of

both extracts was performed in an Agilent Technologies 6890 Plus gas chromatograph coupled to an Agilent Technologies 5973 mass selective detector operated at a full scan of radio frequencies. A J & W Scientific DB - 5MS column (5%- phenyl- poly (dimethylsiloxane), 60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). The compounds in each sample were identified using mass spectrometry data from the NIST MS Search Program, version 2.0.

### HET-CAM Test

For this procedure, the chorioallantoic membrane (CAM) of fertilized chicken eggs of the Hi Line Brown was used. The CAM that surrounds the developing embryo is highly vascular, and it is considered insensitive to pain (15). Eggs were donated by the company ACONDESA, S.A. The procedures undertaken on the eggs were realized according to the provisions of Law 84 of 1989 and resolution 8430 of 1993 of Ministerio de Salud de Colombia, regarding biomedical research on animals.

#### Test preparation

The eggs were placed for eight days at  $37.5^\circ\text{C}$  in an incubator containing an automatic revolving mechanism. After that, the eggs were removed from the incubator and the position of the air sacs was marked with a pencil. Unfertilized eggs or eggs containing embryos were discarded. The remaining eggs were weighed, and only those weighing  $60 \pm 5$  g were used in the HET-CAM test.

#### Samples and solutions

Test samples were the methanolic and hexanic extracts of *U. dermestoides*. Because hexane is irritating for the CAM, this solvent was evaporated of the hexanic extract using a HEIDOLPH 4000-G1 rotary evaporator, and the liquid residue was applied on the CAM; the methanolic extract was used directly in the anti-irritant test. An aqueous solution of sodium dodecyl sulphate (SDS 0.5% w/v) was used as irritating agent. The negative control of the inhibition of irritation reaction was a saline isotonic solution (NaCl 0.9% w/v); the positive control for irritation inhibition reaction was a non-steroid anti-inflammatory drug, Nimesulida (AINEX<sup>®</sup>) at a concentration of 1 mg/mL. The anti-irritant property of the methanolic solution was also evaluated (solvent control). All of the solutions used in the HET-CAM test were daily prepared.

### Standard irritation reaction

The procedure described by Luepcke, 1985 (16), was used, with modifications. Eggs were placed in a Nuair AireGard 201/301 horizontal laminar flow cabinet. Egg shells were cut around the air sacs with a 3200 rpm circular saw with maximum blade capacity of 1/8". Cut sections were removed with a forceps and dissecting tongs. The exposed CAM was humidified with 300  $\mu$ L of isotonic NaCl solution and placed in an incubator for two hours, after which 200  $\mu$ L of SDS 0.5% was placed on the CAM. Three irritation reactions (hemorrhage, lysis, and coagulation) were monitored and registered with a Sony DCR-DVD 610 video camera placed at 35 cm above the CAM. Time was recorded in seconds, from the addition of SDS (time = 0) until the appearance of the three irritation reactions.

### Determination of the anti-irritant capacity

CAM of eggs was exposed as described above and pre-treated with 300  $\mu$ L of testing samples or control solutions. To prevent contamination of the CAM surface, egg-shell openings were covered with paraffin film. Eggs were placed in the incubator for two hours to facilitate absorption by the membranes, and the CAM was then treated with 200  $\mu$ L of SDS 0.5%. Time (in seconds) was monitored until appearance of the irritation reactions. The irritation index (IR) was calculated using the Equation 1.

$$IR = 300 \times (IR) = 5 \times (301 - T_H) + 7 \times (301 - T_L) + 9 \times (301 - T_C). \quad \text{Equation 1}$$

$T_H$ ,  $T_L$  and  $T_C$  are, respectively, the time in seconds from the application of the irritant to the appearance of signs of hemorrhage (H), lysis (L), and coagulation (C) during a period of observation of 300 seconds. Because of the nature of the formula, IR can take values between 0 and 21. To determine the irritation potential of the substances, a classification analogous to the Draizé test was used: not irritating (IR= 0.0 – 0.9), slightly irritating (IR= 1.0- 4.9), moderately irritating (IR= 5.0 – 8.9), and severely irritating (IR = 9.0 – 21). The anti-irritating capacity  $H'$ ,  $L'$ , and  $C'$  of the tested substances was expressed as the relationship between the starting times of irritation reactions

in the CAM pre-treated with testing samples and negative control, using the Equations 2, 3 and 4 (12).

$$H' = T_H / T_{H-SDS}, \quad \text{Equation 2}$$

$$L' = T_L / T_{L-SDS}, \quad \text{Equation 3}$$

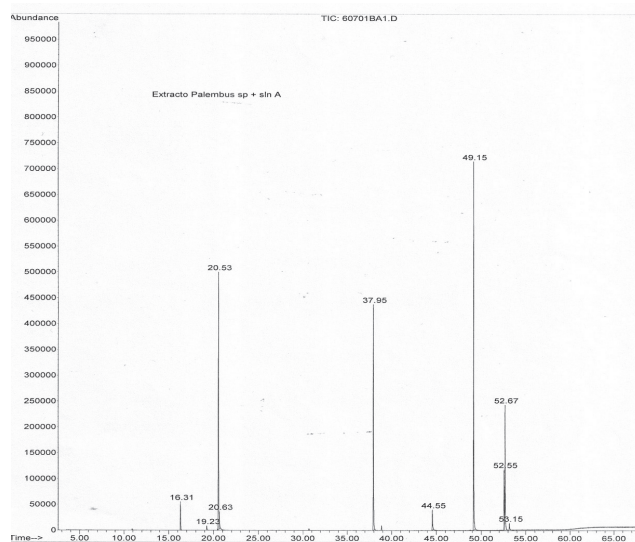
$$C' = T_C / T_{C-SDS}, \quad \text{Equation 4}$$

### Statistical analysis

The HET-CAM test was triplicated for each test sample and controls, the data are expressed as mean  $\pm$  SD. Two group comparisons were performed using Student's t test and statistical significance was accepted at the 95% confidence level ( $p < 0.025$ ). All statistical evaluations were performed using IBM SPSS Statistics 19 for Windows (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Figure 1 presents the chromatographic profile of the whole body methanolic extract of *Ulomoides dermestoides*.



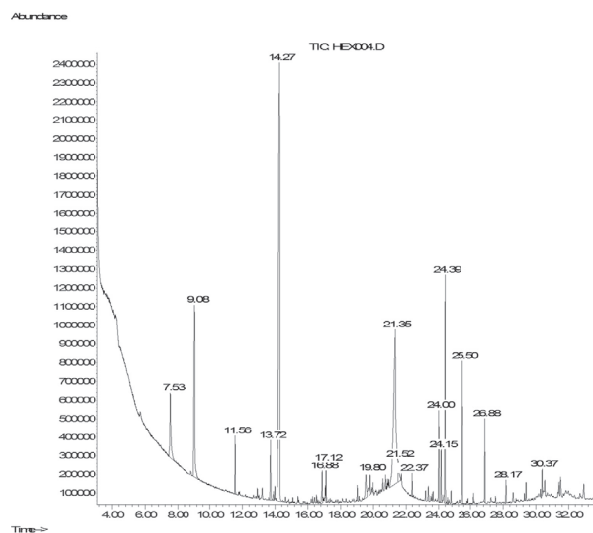
**Figure 1.** Chromatogram of the volatile fraction of the methanolic extract of *U. dermestoides*.

The molecules with the highest relative quantity were pentadecanol (28.85%), methyl palmitate (27.55%), limonene (17.15%), and methyl oleate (11.45%) which can be seen in Table 1.

**Table 1.** Retention time (RT) and relative quantities of compounds identified in the volatile fraction of the methanolic extract of *Ulomoides dermestoides*.

Peak number	RT (min)	Identity	Relative Quantity (%)
1	16.31	Alpha-pinene	1.95
2	19.23	Alpha-terpinene	0.50
3	20.63	Beta-phellandrene	2.10
4	20.53	Limonene	17.15
5	44.55	Methyl myristate	2.50
6	49.15	Methyl palmitate	27.55
7	52.55	Methyl linoleate	7.15
8	52.67	Methyl oleate	11.45
9	53.15	Methyl Stearate	0.80
10	37.95	Pentadecanol	28.85

The chromatographic profile of the hexanic extract is shown in Figure 2.

**Figure 2.** Chromatograph of the hexanic extract of *U. dermestoides*.

The compounds that were identified by GC-MS are shown in the Table 2. The compounds with the highest relative quantity were 1-pentadecene (32.88%), linoleic acid (24.13%), and 2-ethyl-p-benzoquinone (9.93%). Other compounds were 2,5-dimethylquinone, 2,4-Dihydroxy-1-ethylbenzene, limonene, aliphatic hydrocarbons, saturated and unsaturated fatty acids, and long-chain alcohols.

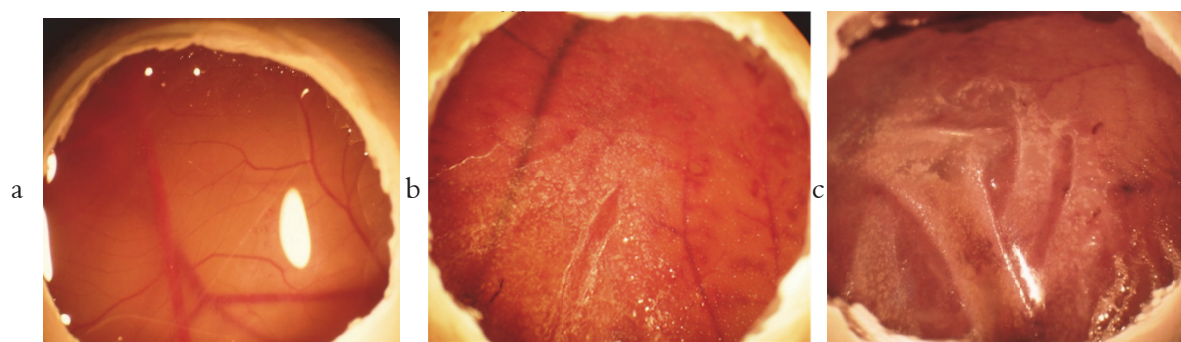
**Table 2.** Retention time (RT) and relative quantities of compounds identified in the hexanic extract of *Ulomoides dermestoides*.

Peak number	RT (min)	Identity	Relative Quantity (%)
1	7.531	Limonene	4.60
2	9.076	2-Ethyl-p-benzoquinone	9.93
3	11.558	1-Tridecene	1.43
4	13.719	2,4-Dihydroxy-1-ethylbenzene	2.04
5	14.273	1-Pentadecene	32.88
6	16.880	2,5- Dimethylquinone	1.24
7	17.119	Myristic acid	0.91
8	19.549	Palmitic acid	1.61
9	19.803	Stearic acid	0.75
10	21.347	Linoleic acid	24.13
11	21.518	Oleic acid	1.40
12	22.373	Hexacosane	0.51
13	23.995	Heptacosane	2.46
14	24.146	5-Nonadecen-1-ol	2.05
15	24.389	9-Eicosen-1-ol	6.73
16	25.493	Octacosane	3.88
17	26.877	Nonacosane	2.13
18	28.167	Tetratriacontane	0.56
19	30.370	17- Pentatriacontene	0.73

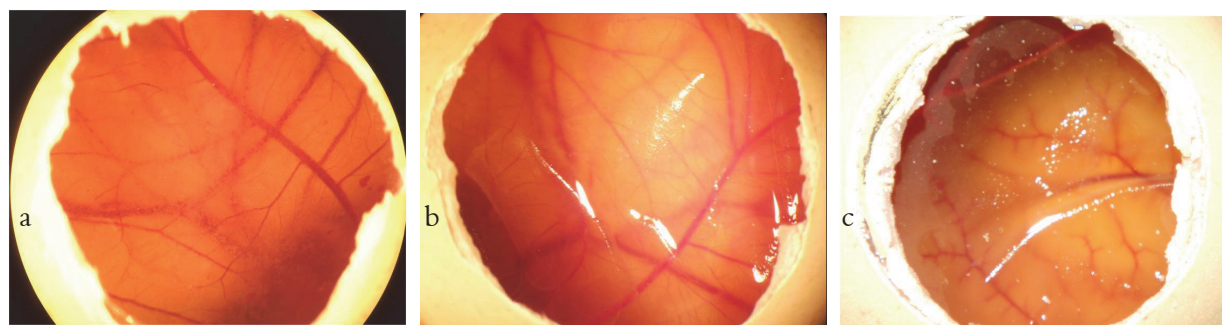
The changes of standard irritation reaction that occur in the CAM are shown in Figure 3. Hemorrhage reaction was observed in the aggrandizement of the major blood vessels and the appearance of small vascular complexes with multiple branches; lysis reaction was evidenced in the rupture of blood vessels and extravasations; clotting reaction was determined by the darkening and hardening of the CAM.

The inhibition of irritant reactions in the group pre-treat with positive control, methanolic extract of *U. dermestoides* and hexanic extract of *U. dermestoides* are shown in Figure 4.

The mean times for the beginning of the irritation reactions in CAM for each one of the tested samples and controls, as well as the mean values of the irritation index and anti-irritant capacity are shown in the Table 3.



**Figure 3.** Irritation reactions of the CAM. This figures show the CAM before addition of SDS 0.5% and the non-desired effects after addition of SDS 0.5% (hemorrhage, lysis and coagulation). a) CAM without SDS; b) Hemorrhage and Lysis; c) Coagulation.



**Figure 4.** Inhibition of irritation reaction of the CAM pre-treated with positive control (Nimesulida) and test samples (ME= Methanolic extract of *U. dermestoides*; HE= Hexanic extract of *U. dermestoides*). This figures show the blood vessels after addition of SDS 0.5%. a) Positive control; b) CAM pre-treated with ME; c) CAM pre-treated with HE.

**Table 3.** Results of the HET-CAM test with different tested substances. IR = irritation index; SD = standard deviation of the three measurements;  $T_{\text{HEM}}$ ,  $T_{\text{LYS}}$ , and  $T_{\text{COA}}$  are, respectively, the mean time for the beginning of the hemorrhage, lysis, and coagulation reactions;  $H'$ ,  $L'$ , and  $C'$  are, respectively, the mean anti-irritant capacity for the hemorrhage, lysis, and coagulation reactions.

Treatment	Mean $\pm$ SD						
	IR	$T_{\text{H}}$	$H'$	$T_{\text{L}}$	$L'$	$T_{\text{C}}$	$C'$
Methanolic extract of <i>U. dermestoides</i>	3.09 $\pm$ 0.11	195 $\pm$ 3.06	12.6 $\pm$ 1.76	266 $\pm$ 4.73	5.92 $\pm$ 0.15	284 $\pm$ 2.0	5.11 $\pm$ 0.15
Hexanic extract of <i>U. dermestoides</i>	20.4 $\pm$ 0.02	2.7 $\pm$ 0.6	0.17 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 1.2	0.19 $\pm$ 0.3	13 $\pm$ 1.0	0.23 $\pm$ 0.1
Negative control (NaCl 0,9%)	18.09 $\pm$ 0.08	15.7 $\pm$ 2.1	1.00 $\pm$ 0.0	45 $\pm$ 1.0	1.00 $\pm$ 0.0	56 $\pm$ 2.08	1.00 $\pm$ 0.0
Solvent control	13.6 $\pm$ 0.12	45 $\pm$ 3.1	2.94 $\pm$ 0.56	115 $\pm$ 3.5	2.55 $\pm$ 0.11	135 $\pm$ 3.06	2.42 $\pm$ 0.10
Positive control (Nimesulida)	2.06 $\pm$ 0.14	205 $\pm$ 3.0	13.24 $\pm$ 1.8	285 $\pm$ 3.1	6.34 $\pm$ 0.2	298 $\pm$ 3.46	5.36 $\pm$ 0.19

## DISCUSSION

The compounds 1- pentadecene, 2-ethyl-p-benzoquinone, limonene, and 1-tridecene identified in the extracts of *U. dermestoides* have been previously reported in studies to determine the chemical characteristics of the defensive secretions and sex-specific pheromones of *U. dermestoides* (17, 18). The monoterpene hydrocarbons alpha-pinene, alpha-terpinene, phellandrene, and dimethylquinones have been reported in the defensive secretions of some Australian tenebrionid beetles (19, 20). Insect defensive secretion is a mixture of repellent

and blocking chemoreceptor substances that are stored in cuticular inclusions or abdominal glands, which are expelled when beetles are stressed. Defensive secretion of beetles has been postulated as a source of pharmacologically active compounds in treatment of respiratory diseases (8, 10, 21). Other compounds identified in the present study were saturated and unsaturated fatty acids and hydrocarbons with chains of 16-35 carbon atoms, some of these compounds have been found in the cuticle of beetles *U. dermestoides* and *Blaps femoralis* (17, 22) and they have been associated with important roles in the biology of beetles, such as sexual com-



munication, preventing desiccation and protecting against pathogens.

In the HET-CAM test, pre-treatment of the CAM with methanolic extracts of *U. dermestoides* decreased the vascular hemorrhaging and membrane coagulation produced for the irritating agent (SDS 0.5%) (Mean of IR=  $3.09 \pm 0.11$ ). There was a significant statistical difference in the irritation index between the group pre-treated with methanolic extract of *U. dermestoides* and negative control group, including the solvent control ( $p = 0.00$ ). In addition, not significant statistical differences were seen in the hemorrhage reaction ( $p = 0.041$ ), coagulation reaction ( $p = 0.028$ ) and lyses reaction ( $p = 0.05$ ) of the CAM between methanolic extract group and positive control group. Hexanic extract of *U. dermestoides* did not show any anti-irritant effect in the CAM test (Mean of IR=  $20.6 \pm 0.14$ ). No statistical differences were observed in the index reaction between the hexanic extract group and negative control group ( $p = 0.00$ ).

The potential anti-irritant capacity of methanolic extract of *U. dermestoides* can be attributed to the components with anti-inflammatory activity. Omega-9 monounsaturated fatty acid (MUFA) and omega-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) may contribute to the anti-irritant capacity of methanolic extracts. A systematic review of electronic databases and bibliographies of selected articles showed that diets rich in oleic acid (omega-9 MUFA) have beneficial effects on inflammation-related diseases (23). Bartoli *et al.*, 2000 (24), reported that oleic acid can influence the metabolism of araquidonic acid (omega-6 PUFA), decreasing the production of pro-inflammatory eicosanoids. Moreover, the anti-inflammatory effect of linoleic acid (omega-6 PUFA) is not clear, several studies have expressed that a high intake of dietary linoleic acid contributes to excess of chronic inflammation. Linoleic acid can be metabolized to araquidonic acid, the substrate for the biosynthesis of a wide array of pro-inflammatory, vasoconstrictive, and/or proaggregatory eicosanoids; but the araquidonic acid is also the substrate for the production of anti-inflammatory and/or anti-aggregatory eicosanoids, such as prostacyclin, lipoxin A4 and epoxyeicosatrienoic acids (25). In the present study, the methanolic extract of *U. dermestoides* showed a higher quantity of oleic acid (11.45%) and lower quantity of linoleic acid (7.15%) compared with hexanic extract (1.4% and 24.13%, respectively). None anti-inflammatory or anti-

irritant activity has been reported for pentadecanol and methyl palmitate.

In addition, the methanolic extract has high quantity of monoterpenes (21.7%) with anti-inflammatory properties as limonene, alpha-terpinene and alpha-pinene (26). Recent findings suggest that D-limonene could be used as a potential anti-inflammatory agent for the treatment of bronchial asthma by suppressing pro-inflammatory cytokines, radical oxygen species (ROS) production, and inactivating eosinophil migration; experiments with RAW 264.7 macrophage cells demonstrated that D-limonene is an effective inhibitor of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) and prostaglandin E(2) production; likewise, D-limonene decreased the expression of pro-inflammatory cytokines TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 in a dose-dependent manner (27). In addition, D-limonene obtained from a fruit peel of a traditional Japanese medicine named Yuzu (*Citrus junos Tanaka*) showed inhibition of the ROS production for eotaxin-stimulated HL-60 clones 15 cell at a low concentration; while at a higher concentration suppressed the cell chemotaxis and production of the monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) via NF- $\kappa$ B activation (28). The anti-inflammatory properties of alpha-pinene and alpha-terpinene have been demonstrated using an inflammatory experimental model in mice and an inhibition test of ovine cyclooxygenases (COX-1 y COX-2), respectively (29, 30).

These results about the anti-irritant capacity of methanolic and hexanic extracts of *U. dermestoides* are preliminary, because it is necessary to evaluate the effect of the extracts concentration on the CAM and the anti-irritant effect of the major components of each extract. In this study the hexanic extract used in the HET CAM test was a concentrated sample and this might influence the results. We propose that the high irritation index of the CAM pre-treated with hexanic extract could be caused by the aliphatic hydrocarbons and quinones (2-ethyl-p-benzoquinone and 2,5-dimethylquinone). Aliphatic hydrocarbons (43.85% of hexanic extract) may cause irritation of the skin and the mucous membranes (31), while quinones (11.17% of hexanic extract) have been reported as highly cytotoxic and/or genotoxic due to the formation of ROS and covalent binding to macromolecules (32, 33). However, the irritant effect of quinones present in the *U. dermestoides* extracts should be confirmed in further studies.



## CONCLUSIONS

The whole-body methanolic and hexanic extracts of *Ulomoides dermestoides* presented volatile and semi-volatile compounds that are characteristic of the defensive secretions and the cuticular surface of tenebrionids. The main compounds in the methanolic extract were fatty acids, pentadecanol and terpenes. The methanolic extract exhibited anti-irritant capacity in a modified HET-CAM test that could be attributed to oleic acid and monoterpenes like limonene; other minor compounds with anti-inflammatory activity were alpha-pinene and alpha-terpinene.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Entomology Department of the Natural Sciences Institute (Universidad Nacional, Bogotá, Colombia) for scientific advice and to ACONDESA for technical support during this study. This investigation was conducted with the support of Universidad del Atlántico, Grupo de Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas.

## REFERENCES

- Dacanay AA, Cervancia CR. Biology of *Palembus (Martianus) dermestoides* Chevrolat (Coleoptera; Tenebrionidae). Philippines Ent. 1989 Apr; 7 (5): 471-477.
- Sandroni P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. Clin Auton Res. 2001 Oct; 11 (5): 303-307.
- Chu GS, Palmieri JR, Sullivan JT. Beetle-eating: a Malaysia folk medical practice and its public health implications. Trop Geogr Med. 1977 Dec; 29 (4): 422 - 427.
- Costa Neto EM, Ramos-Elorduy J. Los insectos comestibles de Brasil: etnicidad, diversidad e importancia en la alimentación. Bol Soc Ent Aragonesa. 2006; 38: 423-442.
- Costa-Neto EM. The use of insects in folk medicine in the state of Bahia Northeastern Brazil, with notes on insects reported elsewhere in Brazilian folk medicine. Human Ecol. 2002 Jun; 30 (2): 245-263.
- Flores GE, Padín SB, Stetson RE. First records of the Oriental species *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) in Argentina. Rev Soc Entomol Argent. 2002; 61 (3/4): 48-50.
- Capul-Magaña FG. Sobre el uso de *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878), (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperini) en la coleopteroterapia: informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México. Boln Asoc Esp Ent. 2010; 34 (3-4): 419-422.
- Crespo R, Villaverde ML, Girotti JR, Güerci A, Juárez MP, de Bravo MG. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. J Ethnopharmacol. 2011 Jun 14; 136 (1): 204-209.
- Santos RC, Lunardelli A, Caberlon E, Bastos CM, Nunes FB, Pires MG, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. Inflammation. 2010 Jun; 33 (3): 173-179.
- Wahrendorf MS, Wink M. Pharmacologically active natural products in the defence secretion of *Palembus ocularis* (Tenebrionidae, Coleoptera). J Ethnopharmacol. 2006 Jun; 106 (1): 51-56.
- Nia R, Paper DH, Essien EE, Oladimeji OH, Iyadi KC, Franz G. Investigation into In vitro radical scavenging and in vivo anti-inflammatory property of *Tridax procumbens*. Niger J Physiol Sci. 2003; 18 (1-2): 39-43.
- Wilson TD, Steck WF. A modified HET-Cam assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. Food Chem Toxicol. 2000 Oct; 38 (10): 867-872.
- Moura do Carmo DF, Amaral AC, Machado GM, Leon LL, Silva JR. Chemical and Biological Analyses of the Essential Oils and Main Constituents of Piper Species. Molecules 2012 Feb; 17: 1819-1829.
- Unruh L, Rongda X, Kramer K. Benzoquinone levels as a function of age and gender of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem Mol Biol. 1998 Aug; 28 (12): 969-977.
- Bagley DM, Waters D, Kong BM. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. Food Chem Toxicol. 1994 Dec; 32 (12): 1115-1160.
- Luepcke N.P. HET-chorioallantois-test: an alternative to the Draize rabbit eye test. In: Goldberg, A.M. (Ed.), In Vitro Toxicology. New York, USA: Mary Ann Libert Inc. Publishers; 1985. 353-363 p.
- Villaverde ML, Girotti JR, Mijailovsky SJ, Pedrini N, Juárez MP. Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2009 Dec; 154 (4): 381-386.
- Martins CBC, Zarbin PHG, Almeida LM. Evidence for sex-specific pheromones in *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae). Fla Entomol. 2010 Dec; 93 (4): 639-641.
- Geiselhardt S, Schmitt T, Peschke K. Chemical composition and pheromonal function of the defensive secretions in the subtribe Stizopina (Coleoptera, Tenebrionidae, Opatrini). Chemoecology. 2009 Jun; 19 (1): 1-6.
- Brown WV, Doyen JT, Moore BP, Lawren JF. Chemical composition and taxonomic significance of defensive secretions of some Australian Tenebrionidae (Coleoptera). J Aust Ent Soc. 1992 Feb; 31 (1): 79-89.
- Howard RW, Jurenka RA, Blomquist GJ. Prostaglandin synthetase inhibitors in the defensive secretion of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera:Tenebrionidae). Insect Biochem. 1986 Jun; 16 (5): 757-760.
- Gunbilig D, Boland W. Defensive Agents of *Blaps femoralis* a Traditional Mongolian Medicinal Insect. Sci Pharm. 2009 Jul; 77 (3): 597-604.
- Carrillo C, Cavia Mdel M, Alonso-Torre S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. Nutr Hosp. 2012 Jul; 27 (4): 978-990.
- Bartoli R, Fernandez-Banares F, Navarro E, Castella E, Mane J, Alvarez M, et al. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. Gut 2000 Feb; 46 (2): 191-199.
- Harris WS, Mozaffarian D, Rimm E, Kris-Etherton P, Rudel LL, Appel LJ, et al. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation. 2009 Feb; 119 (6): 902-907.
- da Silveira R, Andrade L, de Sousa D. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. Molecules. 2013 Jan; 18 (1): 1227-1254.
- Yoon WJ, Lee NH, Hyun CG. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. J Oleo Sci. 2010; 59 (8): 415-421.
- Hirota R, Roger NN, Nakamura H, Song HS, Sawamura M, Saganuma N. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos Tanaka*) essential oil on eosinophils. J Food Sci. 2010 Apr; 75 (3): H87-92.
- Quintão NL, da Silva GF, Antoniali CS, Rocha LW, Cechnel Filho V, Ciccio JF. Chemical composition and evaluation of the anti-hypernociceptive effect of the essential oil extracted from the leaves of *Ugni myricoides* on inflammatory and neuropathic models of pain in mice. Planta Med. 2010 Sep; 76 (13): 1411-1418.
- Kawata, J.; Kameda, M.; Miyazawa, M. Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a p-methane skeleton. Int J Essent Oil Ther. 2008 Dic; 2 (4): 145-148.
- Patlolla RR, Mallampati R, Fulzele SV, Babu RJ, Singh M. Dermal microdialysis of inflammatory markers induced by aliphatic hydrocarbons in rats. Toxicol Lett. 2009 Mar; 185 (3): 168-174.
- Yang F, Zhou J. Cytotoxicity and DNA damage induced by 1, 4-benzoquinone in v79 Chinese hamster lung cells. J Toxicol Environ Health, Part A. 2010 Jan; 73 (7): 483-489.
- Ruiz-Ramos R, Cebrian ME, Garrido E. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. Toxicology. 2005 May; 209 (3): 279-287.

# LAS ESTATINAS: QUÍMICA, TÉCNICAS ANALÍTICAS, BIOSÍNTESIS Y FARMACOCINÉTICA

## STATINS: CHEMISTRY, ANALYTICAL TECHNIQUES, BIOSYNTHESIS AND PHARMACOKINETICS

Ivonne J. NIETO-RAMIREZ D.Sc.<sup>1</sup>, Carolina CHEGWIN-ANGARITA M.Sc.<sup>1\*</sup>,  
Lucía ATEHORTÚA Ph.D.<sup>2</sup>, Liuda J. SEPÚLVEDA A. Q.F.<sup>2</sup>

Recibido: Abril 10 de 2012 Aceptado: Mayo 16 de 2013

### RESUMEN

**Antecedentes:** Las estatinas presentan principalmente un efecto hipocolesterolémico, pero asimismo acciones biológicas adicionales, como efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, actividad antioxidante, reducción de la incidencia de algunos tipos de cáncer, efectos benéficos en el metabolismo óseo y en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y el SIDA. Se dividen en dos clases: las estatinas naturales y las sintéticas, las cuales surgen como producto de la necesidad de potencializar el efecto de las primeras. Estas propiedades han impulsado las investigaciones encaminadas a la comprensión de su comportamiento químico y sus propiedades fisicoquímicas, así como la comprensión de la relación entre sus estructuras y las ya mencionadas actividades. Su estudio ha permitido el desarrollo de técnicas analíticas eficientes tanto para su determinación en diferentes matrices, como la optimización de los procesos de extracción, separación, cuantificación y elucidación estructural, así como ahondar en el planteamiento de sus rutas biosintéticas, lo que aportará herramientas para poder intervenir, mediante la biotecnología, en los procesos biosintéticos, buscando el aumento de su producción por un organismo específico. **Objetivos:** El objetivo de este trabajo es presentar una revisión de la química, biosíntesis, farmacocinética y técnicas analíticas para la determinación de las estatinas con el fin de aportar, de manera rápida, conocimientos a quienes realizan investigaciones sobre estos metabolitos. **Métodos:** La revisión abarcó los últimos 12 años y se efectuó realizando la selección de aquellas investigaciones más relevantes que permiten conocer la química, las variaciones estructurales, las técnicas analíticas empleadas para la determinación de las estatinas y sus rutas biosintéticas. Asimismo, se pretendió abarcar un conocimiento general de sus acciones biológicas, farmacología y farmacocinética, tópicos estrechamente relacionados con sus diferencias estructurales. **Resultados:** Se obtiene un panorama general de los principales aspectos para el estudio de las estatinas, permitiendo seleccionar los mejores parámetros de acuerdo con lo requerido por los diferentes investigadores en el área. **Conclusiones:** La identificación de las estatinas requiere de diferentes procedimientos de extracción y separación, siendo los más empleados la SOE y la HPLC, respectivamente. Sus acciones biológicas están íntimamente relacionadas con su estructura. Los estudios de su toxicidad en mamíferos han demostrado que no hay evidencia de efecto carcinogénico, mutagénico, ni tóxico.

**Palabras clave:** Estatinas, actividad biológica, farmacología, farmacocinética

---

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: cchegwina@unal.edu.co

## ABSTRACT

**Background:** Statins show mainly a hypochlosterolemic effect but also present additional biological actions such as anti-inflammatory and immune-modulator, antioxidant activity, reduction of the incidence of some types of cancer, beneficial effects on bone metabolism, as well as in the treatment of neurodegenerative diseases, and AIDS. They are divided in two types; natural statins and synthetic statins, which arise from the need of increasing the effect of the former ones. These properties have encouraged researches to aim at the comprehension of their chemical behavior and physical-chemical properties, as well as the comprehension of the relationship between their structures and the activities aforementioned. This study has allowed the development of efficient analytic techniques both for their determination in different matrices and the optimization of the obtaining process, separation, quantification and structural elucidation, as well as to examine in depth the raising of biosynthetic routes, which will give tools that enable to intervene through biotechnology in the biosynthetic processes, searching for the increase of its production by a specific organism. **Objectives:** The purpose of this work is to present a review of chemistry, biosynthesis, pharmacopeia and analytic techniques with the aim of quickly contribute to the knowledge of the ones performing researches on these metabolites. **Methods:** This review approaches the last 12 years and was carried out by performing the selection of the most relevant researches that allow knowing the statins chemistry, structural variations, the analytic techniques used for their determination, and their biosynthetic routes as well. Likewise, it was intended to cover a general knowledge of their biological, pharmacological, and pharmacokinetic aspects, topics closely related with their structural differences. **Results:** A general approach of the main aspects for the study of statins is obtained. This allows selecting the parameters according to the required by different researchers on this area. **Conclusions:** The identification of statins requires of different obtaining and separation processes, being SOE and HPLC the most used, respectively. Their biological actions are closely related with their structure. Studies on toxicity in mammals have demonstrated that there is no evidence of cancerogenic, mutagenic, and toxic effects.

**Keywords:** Statin, analytical techniques, pharmacology, pharmacokinetic.

## INTRODUCCIÓN

En la comunidad científica día a día se trabaja en la búsqueda de medicamentos que ayuden a la solución de diferentes dolencias que aquejan a la sociedad, como es el caso de las enfermedades cardiovasculares, en particular la enfermedad coronaria, considerada la principal causa de mortalidad en los países desarrollados, siendo la aterosclerosis el común denominador dentro de la mayoría de los pacientes. Aunque el desarrollo de la aterosclerosis depende de una compleja interacción entre diversos factores y procesos, se ha establecido una clara asociación entre los niveles elevados de colesterol en plasma y el aumento de la enfermedad aterosclerótica (1). Las estatinas han demostrado ser una excelente alternativa para reducir los niveles de colesterol y adicionalmente presentan un importante número de efectos pleiotrópicos, definidos éstos como todas aquellas bioacciones de un medicamento que son independientes de las originales para las que fue concebido, a saber: actividad antiinflamatoria, antioxidante, tratamientos para enfermedades del sistema nervioso

central, enfermedades autoinmunes, gastrointestinales, osteoporosis, degeneraciones maculares, entre otras (2). Las primeras estatinas descubiertas fueron aisladas de hongos micromicetos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Monascus* y posteriormente se encontró que también son biosintetizados por macromicetos del género *Pleurotus* (3, 4). La biotecnología ha desempeñado un papel fundamental en lo que respecta a la optimización de las condiciones para favorecer la biosíntesis de estos bioactivos por procesos fermentativos. La química ha contribuido en la construcción de las bases del estudio de las estatinas, elucidando sus estructuras y estableciendo la relación estrecha que éstas tienen con sus bioacciones, investigando acerca de cómo ocurren los procesos biosintéticos en los hongos para poder intervenir en ellos y favorecer su biosíntesis desde un organismo en particular, lo que requiere del desarrollo de procesos de aislamiento, separación y posterior purificación. Esta disciplina, de la mano de la farmacología, ha permitido determinar cómo ocurren los procesos de absorción, distribución, biotransformación y posterior excreción de estos compuestos.

En esta revisión se presenta una visión de los aspectos más importantes de las diferentes investigaciones relacionadas con la química de las estatinas, pasando por todas las etapas descritas antes y que han sido el pilar para la construcción del importante desarrollo que se tiene en la actualidad sobre este prometedor grupo de medicamentos.

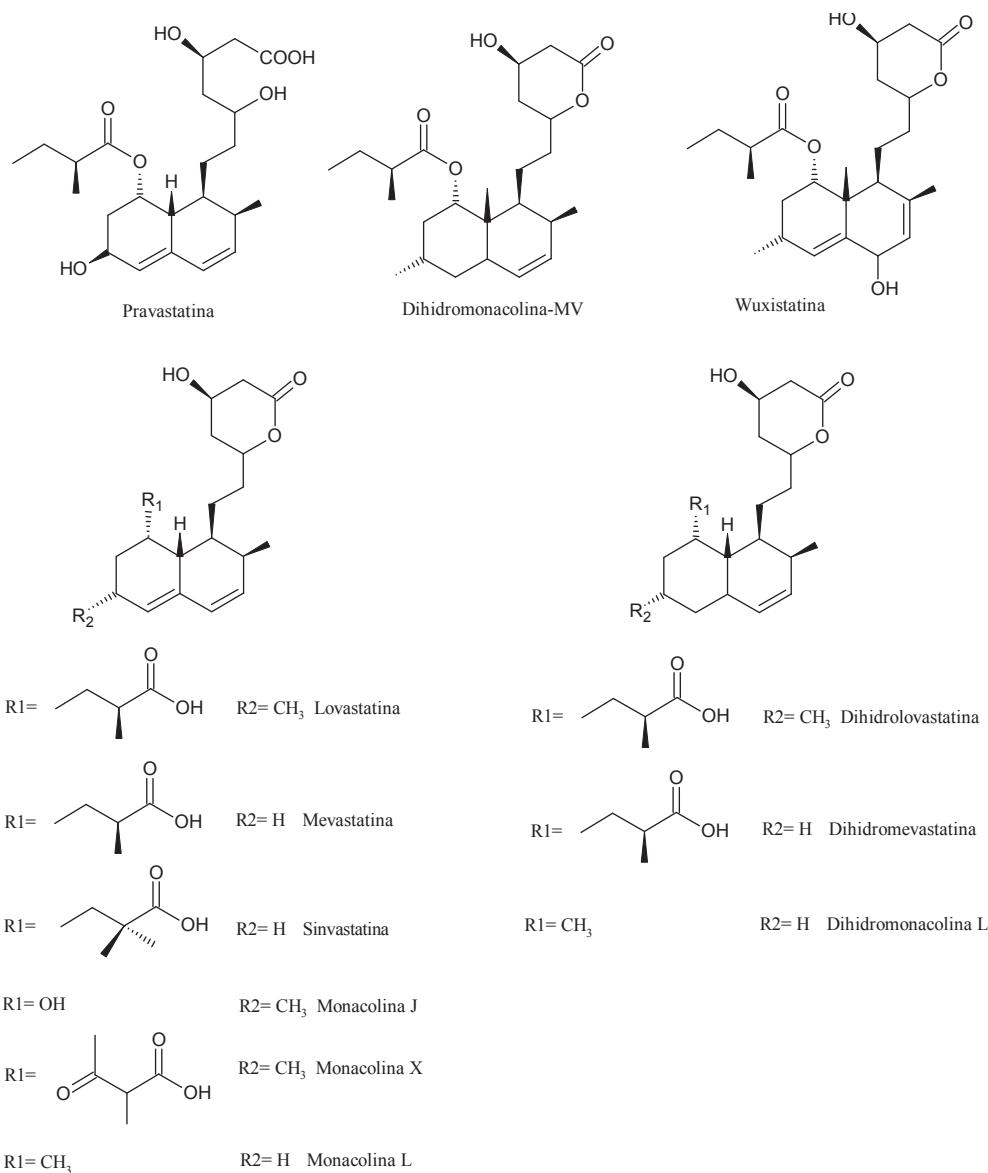
## GENERALIDADES

Las estatinas conforman un grupo de medicamentos empleados inicialmente por su efecto hipocolesterolémico, pero el avance de las investigaciones sobre sus propiedades biológicas han permitido determinar que estos compuestos exhiben a la vez importantes efectos pleiotrópicos que ponen de manifiesto sus bondades en tratamientos para esclerosis múltiple, desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, cardiopatías no isquémicas, prevención de fracturas y regularmente reducción en la incidencia de algunos tipos de cáncer, así como el debilitamiento del potencial metastásico (1). Estas características no están relacionadas con su efecto en la disminución del colesterol sino con una posible acción antiinflamatoria (5).

Se pueden dividir en dos grupos: las de origen natural y aquellas que son productos de síntesis. Dentro de las primeras se encuentran: lovastatina, simvastatina, pravastatina y mevastatina, producidas por algunos hongos nativos o por procesos fermentativos, mientras que la fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina y pitavastatina (NK-104) son producto de síntesis (6). Una de las ventajas de las estatinas naturales es que no presentan los efectos secundarios exhibidos por las sintéticas. La primera estatina natural, mevastatina (compactina), fue aislada de *Penicillium citrinum* en 1971 y de ella no se conoce hasta el presente uso clínico (3). En la actualidad las comercialmente disponibles son lovastatina (Mevacor<sup>®</sup>, Merck Frosst), pravastatina (Pravachol<sup>®</sup>, Bristol-Meyers Squibb), simvastatina (Zocor<sup>®</sup>, Merck Frosst), fluvastatina (Lescol<sup>®</sup>, Novartis), atorvastatina (Lipitor<sup>®</sup>, Parke-Davis) y rosuvastatina (Crestor<sup>®</sup>, Astra-Zeneca) (7). Para el caso específico de la cerivastatina (Baycol<sup>®</sup>/Lipobay<sup>®</sup>, Bayer), que se comercializó durante un buen periodo de tiempo, fue voluntariamente retirada del mercado desde 2001 después de determinar clínicamente que su empleo produce rabdomiolisis. Dentro de las estatinas sintéticas de última generación se encuentra la pitavastatina, la cual está disponible para uso en Japón, y en Europa se encuentra en la fase III de prueba (8).

## ESTRUCTURA DE LAS ESTATINAS

La clasificación dada a las estatinas puede aplicarse teniendo en cuenta la estrecha relación que las mismas guardan con su estructura. Todas las naturales conocidas como tipo I, poseen una mayor porción policétida que las del tipo II, presentan en común el anillo hexahidronaftaleno funcionalizado con un éster  $\alpha$ -metilbutírico y una  $\beta$ -hidroxi- $\delta$ -lactona enlazada por un puente etilénico, pero difieren las unas de las otras por la posición de los metilos sobre el anillo y la cadena lateral, como es el caso de la lovastatina (Mevinolina, Monacolina K, Mevacor) que contiene una cadena lateral metilbutírica y un grupo 6- $\alpha$ -metilo, ausente en la mevastatina (Compactina, ML-236B, CS-500). La pravastatina (Eptastatina, Pravacol) en su forma comercial se encuentra como la sal sódica del  $\beta$ -hidroxiácido. La simvastatina (Sinvinolina, Zocor) contiene un grupo metilo adicional en la posición 2' de la cadena lateral (9). El anillo de la  $\beta$ -hidroxi- $\delta$ -lactona de estos compuestos puede sufrir una apertura hidrolítica y convertirse en los correspondientes ácidos 3',5'-dihidroxiheptanoicos, que son las formas activas y las responsables del efecto inhibidor de la Hidroximetilglutaril (HMG) CoA reductasa (10). Adicionalmente, a estos compuestos se ha identificado y caracterizado otros estructuralmente relacionados como la dihidrolovastatina y la dihidromevastatina aisladas de *Aspergillus terreus*, las monacolininas X y M extraídas de *Monascus ruber*, que tienen diferencias en el C8 de la cadena lateral (11). Las monacolininas J y L aisladas de *Aspergillus terreus*, con la ausencia de la cadena metilbutírica de la lovastatina. En la monacolina J un grupo hidroxilo está presente en el C8, mientras que éste es sustituido por un hidrógeno en la monacolina J y la dihidromonacolina L (9). La dihidromonacolina-MV es la estatina más recientemente aislada de *Monascus purpureus* y se caracteriza por ser un derivado de la dihidrolovastatina, donde el grupo éster corresponde a un 2-metilpropionato (12). Zhuge *et al.*, 2008 (13), reportaron el aislamiento de la Wuxistatina como producto de bioconversión de la lovastatina por parte de una cepa bacteriana de *Amycolatopsis sp.*, adicionando un hidroxilo en la posición 5, derivándose así un aumento de cuatro veces su efecto inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En la figura 1 aparecen las estructuras de las diferentes estatinas naturales, donde se puede ver claramente las diferencias estructurales antes descritas.

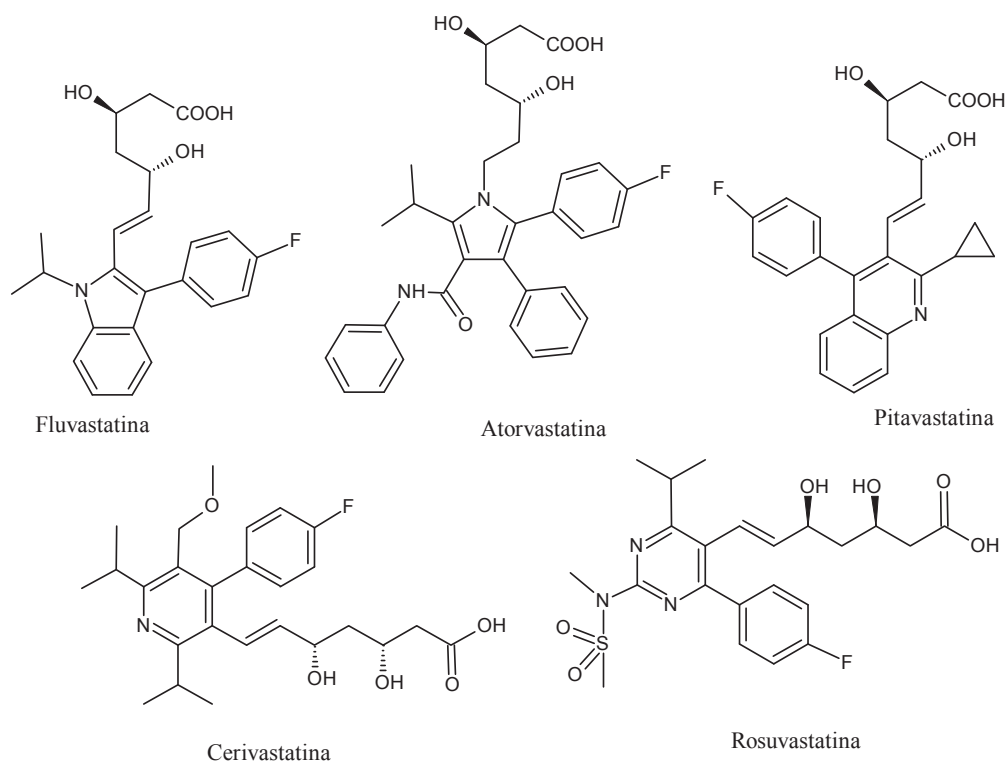


**Figura 1.** Estructuras de las estatinas tipo I.

Con respecto a las estatinas del tipo II, éstas surgieron como producto de las diversas investigaciones adelantadas en busca de la obtención de un medicamento hipocolesterolémico, con una acción farmacológica potenciada con respecto a las estatinas naturales. Las estructuras de la atorvastatina (Lipitor), fluvastatina (Lescol) y cerivastatina (Baycol y Lipobay) son distintas entre sí y muy diferentes a las estatinas naturales.

Únicamente la porción afín con la HMG CoA reductasa, responsable de su acción inhibitoria, es común a ambos tipos de estatinas (9). Todas ellas son de magnitud molecular más grande que las naturales y tienen en común una cadena lateral fluorofenil, un grupo metiletil y un ácido heptenoico (8). La pitavastatina es una estatina nueva y altamente efectiva que ya está disponible para su uso en algunos países (14). En la figura 2 se encuentran las estructuras de las estatinas del tipo II.





**Figura 2.** Estructuras de las estatinas tipo II.

Las características estructurales previamente especificadas están estrechamente relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de las estatinas. Existen diferencias entre su lipofilia, tal como se puede apreciar en la tabla 1, las cuales se reflejan en su facilidad de paso a través de las membranas celulares por difusión pasiva, y explica por qué la pravastatina no atraviesa fácilmente las membranas celulares mientras que la simvastatina sí lo hace (15).

**Tabla 1.** Comparación de la lipofilia de diferentes estatinas (15)

ESTATINA	LIPOFILIA A pH 7,4 (log + SE)	ESTATINA	LIPOFILIA A pH 7,4 (log + SE)
Cerivastatina	1,69 ± 0,02	Atorvastatina	1,11 ± 0,02
Sinvastatina	1,60 ± 0,06	Rosuvastatina	-0,33 ± 0,06
Fluvastatina	1,27 ± 0,07	Pravastatina	-0,84 ± 0,06

## MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La solubilidad es dentro de las propiedades fisicoquímicas una de las más fundamentales y particularmente útil en una amplia variedad de aplicaciones biológicas, químicas, farmacéuticas y ambientales. Esta propiedad es la base para una selección adecuada de la técnica de extracción que se debe aplicar para el estudio de un componente

específico en cualquier matriz. En los últimos años se han realizado estudios relacionados con la solubilidad de algunas estatinas en diferentes disolventes orgánicos, en su mayoría alcoholes (16, 17) y en acetato de etilo (7, 18). En esta última investigación los autores determinaron que las extracciones desde medios acuosos son más eficientes a pH bajos. Lee *et al.*, 2007 (19), reportan el uso de ultrasonido como una herramienta eficiente, simple y segura para realizar la extracción de lovastatina desde cápsulas de *Monascus*.

El interés por el desarrollo de técnicas óptimas para la determinación de estatinas en formulaciones farmacéuticas y en matrices biológicas que requieren el uso indispensable de procedimientos para la eliminación de interferencias, ha incrementado la evaluación de técnicas que permitan lograr este objetivo. Entre éstas se incluye la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y extracción con disolventes orgánicos sobre matrices sólidas (SOE) (20). Pansuriya *et al.*, 2009 (21), evaluaron el empleo de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico con metanol como cosolvente, para aislar las formas tanto lactónica como hidroxilada de la lovastatina obtenida por fermentación en estado sólido de *Aspergillus terreus* sobre salvado de trigo.

Los autores resaltan las ventajas de esta técnica como son: limpieza, seguridad, no inflamabilidad, no corrosividad, no toxicidad, empleo de solventes eco amigables, no contaminantes y libres de residuo perjudicial, concluyendo que la metodología empleada tiene potencial para el aislamiento de la estatina a partir del producto obtenido por la fermentación y con menos impurezas que las metodologías reportadas hasta este momento. Más recientemente, Martín *et al.*, 2011 (7), comparan la extracción por sorción en barra de agitación (SBSE), la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) y la SPE para analizar la presencia de los inhibidores en aguas residuales, concluyendo que la SPE genera los mejores resultados para la mayoría de los analitos (74-93% en agua pura, 46-97% en muestras de río y 64-93% en aguas residuales de efluentes). La pravastatina fue pobremente extraída por DLLME hasta el punto de no ser determinada. La SBSE únicamente se pudo emplear con la lovastatina y la simvastatina pero con proporciones de recuperación de 19 y 38%, respectivamente; De igual manera, mencionan que a pesar de la baja precisión de la DLLME y la SBSE sobre la SPE, ofrecen algunas ventajas: ambas técnicas son simples, presentan bajos efectos matriz y requieren pocos volúmenes de disolventes orgánicos.

## MÉTODOS DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Dentro de las técnicas de separación de las estatinas se incluye la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía de gases (CG), siendo la primera de ellas la más empleada, prevaleciendo la utilización de separaciones en fase reversa y el uso de detectores UV y DAD, raramente se emplea detectores de fluorescencia o de espectrometría de masas (MS) (20). Sin embargo, estos métodos traen consigo algunos problemas como son la complejidad de los procedimientos, el consumo de disolventes orgánicos grado cromatográfico, la polución por los mismos y el consumo de columnas cromatográficas. Estas desventajas han llevado al uso de la electroforesis capilar de alta eficiencia, constituyéndose en una opción con ventajas tales como los bajos costos de los análisis, el volumen pequeño de muestra, la automatización y la alta selectividad (22-24). Damic *et al.*, 2010 (22), y Nigovic *et al.*, 2008 (23), evaluaron el efecto del pH y de la concentración del buffer usado, la

influencia de un modificador orgánico, del voltaje aplicado y validaron el método, concluyendo que su uso es confiable, simple, seguro, de bajo costo y puede ser empleado en matrices complejas con sensibilidades que están en el orden de los ng/ml. Recientemente se ha empleado cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) como una herramienta que provee mayores factores de capacidad, mejor resolución, aumento de sensibilidad y alta velocidad de análisis con límites de detección de 0,08ng/ml en tiempos de análisis de 2 min (25). Jun-Jun *et al.*, 2009 (26), utilizaron espectrometría de masas séxtuple (MS<sup>1</sup>-MS<sup>6</sup>) en modo positivo con ionización por electrospray para la determinación de monacolina J, obteniendo información muy completa y útil sobre el patrón de fragmentación de esta molécula.

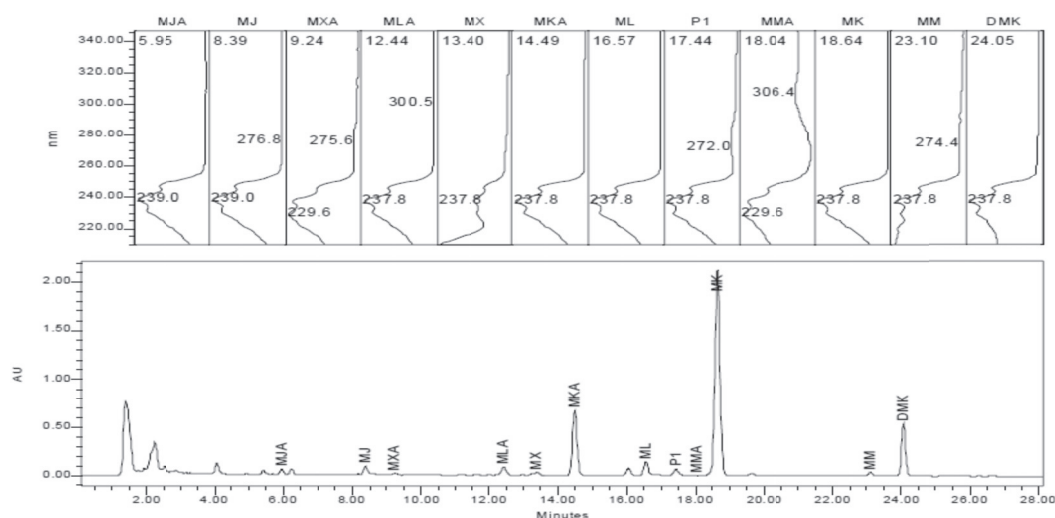
En revisiones previas se presenta aspectos relacionados con las técnicas de análisis de las diferentes estatinas como la de Nirogi *et al.*, 2007 (8), quienes se enfocaron en las técnicas de cuantificación utilizando MS como método de detección para la atorvastatina, simvastatina, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina y pitavastatina, resaltando que el empleo de HPLC en combinación con espectrometría de masas en modo tándem (MS/MS) es la técnica analítica con mejores ventajas para la cuantificación de las estatinas en muestras biológicas. En el mismo año Hernando *et al.*, 2007 (27), exploraron la LC-MS para la determinación de estatinas en muestras ambientales, determinando que la aplicación de esta técnica permite la detección de concentraciones en niveles de trazas en diferentes matrices acuosas y muestras de suelos. Los autores hacen una detallada descripción y análisis de las diferencias entre los métodos empleados, las condiciones de las corridas y el efecto matriz que puede influenciar drásticamente en la sensibilidad y reproducibilidad del método. Nováková *et al.*, 2008 (28), estudiando la aplicación de los métodos de HPLC en la determinación de simvastatina y atorvastatina en varios campos de aplicación y contemplando la interconversión entre las formas ácidas y lactónicas de las estatinas, concluyeron que la LC-MS/MS se posiciona como el método de elección para los análisis en mención debido a su alta selectividad y sensibilidad.

A pesar de ser la cromatografía HPLC con diferentes detectores la técnica por excelencia empleada para la determinación de estatinas en distintas matrices, también hay reportes relacionados con

el empleo de otras técnicas. Tharpa *et al.*, 2009 (29), usaron titulaciones indirectas con mezclas de bromato-bromuro en medio ácido como agentes bromadores y tiocianato de hierro (III) como agente auxiliar, para la determinación de simvastatina en medicamentos comerciales. Este método tiene las ventajas de ser exacto y preciso, además de estar libre de las interferencias comúnmente encontradas en los excipientes de las tabletas. Asimismo, en este artículo mencionan diversas técnicas espectrofotométricas, resaltando que su investigación es la primera en reportar el uso de una titulación. Hacen alusión al empleo de la reducción por la simvastatina de hierro (III) a hierro (II) y la subsecuente formación de azul de Prusia con ferricianuro, que es determinado a 730 nm. Igualmente, mencionan la opción de quelatar el hierro (II) formado con 1,10-fenantrolina o 2,2'-bipiridina y medir el producto formado a 480 ó 490 nm. Finalmente, haciendo alusión al estudio

de Vijaya *et al.*, emplearon la formación de un color amarillo por la unión de simvastatina con nitrato férrico en ácido nítrico concentrado.

Con respecto a la identificación de las estatinas, la mayoría de las técnicas que se encuentran reportadas emplean detectores UV o DAD, debido a que ellas presentan un espectro de absorción característico con un máximo en 237 nm y dos hombros en 227 nm y 243 nm, generados por el anillo hexahidronaftaleno de las estatinas tipo I. La identificación generalmente se hace por comparación de los tiempos de retención con patrones ya reportados, como en el estudio de Yong-Guo *et al.*, 2004 (30), quienes identificaron 14 estatinas en el arroz rojo fermentado utilizando para su separación y posterior identificación HPLC-DAD y MS. En la figura 3 está el perfil por HPLC-DAD para el extracto etanólico del arroz rojo fermentado.



**Figura 3.** Perfil por HPLC-DAD de las estatinas presentes en arroz rojo fermentado. **MJA**: monacolina J hidroxiláica; **MJ**: monacolina J; **MXA**: monacolina X hidroxiláica; **MLA**: monacolina L hidroxiláica; **MX**: monacolina X; **MKA**: monacolina K hidroxiláico; **ML**: monacolina L; **P1**: mevastatina; **MMA**: monacolina M hidroxiláica; **MK**: monacolina K; **MM**: monacolina M; **DMK**: dihidromonacolina K (30).

Millership *et al.*, 2001 (31), resaltan la importancia de tener cuidado con los casos específicos en donde la determinación de las estatinas se realiza en medicamentos de uso comercial, debido a la posible presencia de algunos excipientes que interfieren cuando se emplean medidas directas de absorbancia como ocurre con el ácido ascórbico. Los autores emplearon espectroscopia de derivadas para eliminar ese problema con excelentes resultados.

En lo referente al desarrollo de métodos para la identificación simultánea de las estatinas tipo I y II existen pocas investigaciones. Pasha *et al.*, 2006 (32), determinaron lovastatina, simvastatina, pravastatina, atorvastatina y rosuvastatina en formulaciones farmacéuticas y en estudios *in vitro* usando LC-UV en un tiempo de 36 min. Gomes *et al.*, 2009 (33), reportaron la validación de un método por HPLC-UV con arreglo de diodos para determinar pravastatina.

tatina, atorvastatina, rosuvastatina y fluvastatina en productos farmacéuticos con tiempos no mayores a 5 min, pero en corridas cromatográficas distintas. Los autores se enfocaron en que los métodos fueran específicos para determinaciones cuantitativas en presencia de los productos de degradación respectivos para cada medicamento. Al año siguiente Damic *et al.*, 2010 (22), desarrollaron un método para la determinación de lovastatina, simvastatina,

pravastatina, atorvastatina, fluvastatina y rosuvastatina en una sola corrida utilizando cromatografía capilar electrocinética miceliar (MEKC) con excelentes resultados en términos de separación y con un tiempo de análisis inferior a los 5 min. La tabla 2 presenta, a manera de ejemplo, algunos de los métodos de extracción y separación empleados actualmente.

**Tabla 2.** Métodos de extracción, separación e identificación empleados para el estudio de las estatinas.

ESTATINA	MEDIO	EXTRACCIÓN	TECNICA DE SEPARACIÓN	DETECTOR	REF.
LOVL	380 cepas fúngicas	SOE	HPLC	UV	(4)
LOVL	Fructificaciones de <i>Pleurotus ostreatus</i>	SOE	HPLC	UV	(4, 34)
LOVL, COM, PRAH y Monacolina J	Caldo de cultivo y micelio de <i>Aspergillus terreus</i>	LLE y SOE	HPLC	UV	(35)
LOVL, PRAH, COM y Monacolina J	Micelio y medio agotado de <i>Aspergillus y Monascus</i>	SOE, LLE	HPLC	UV	(36)
LOVL LOVH	Plasma	SPE	HPLC	UV	(37)
LOVL	Micelio de <i>Monascus ruber</i>	SOE	HPLC	UV	(38)
LOVH	Medio agotado de <i>Aspergillus terreus</i>	Dilución	HPLC	UV	(39)
LOVL LOVH	Estándar	SOE	HPLC CE	UV	(40)
PRAH LOVL SIML	Muestras acuosas	SPE	LC	MS/MS	(41)
LOVL	Micelio, medio agotado y fructificaciones de <i>Pleurotus ostreatus</i>	SOE	HPLC	UV	(42, 43)
SIM	Preparaciones farmacéuticas	SOE	HPTLC	Densitometría de barrido	(44)
LOVL	Arroz rojo fermentado	SOE	HPLC	DAD	(45)
LOVL, LOVH	<i>Monascus ruber</i>	SOE	HPLC	DAD	(46)
LOVH	Medio de cultivo de <i>Aspergillus terreus</i>	LLE	HPLC	UV	(47)
PRAH	Caldo de fermentación	Dilución	HPLC EC	UV	(24)
SIML SIMH	Plasma humano	SPE	HPLC	MS/MS	(48)
LOVH	Micelio de <i>Aspergillus flavipes</i>	SOE	HPLC	UV	(49)
PRAH	Plasma y orina	SPE	HPLC	UV	(50)
LOVL, LOVH, SIML, SIMH, PRAH	Te Pu-Erh	SPE	HPLC	UV	(51)
LOVH	Medio de cultivo de <i>Aspergillus terreus</i>	Dilución	HPLC	UV	(52)
LOVH	Medio de cultivo de <i>Aspergillus terreus</i>	LLE	HPLC	DAD	(53)
LOV	Cápsulas de <i>Monascus</i>	SOE	HPCE	UV-VIS	(19)
COM	<i>Penicillium brevicompactum</i>	SOE	HPLC	UV	(54)
PRAH	Productos farmacéuticos	Dilución	CE MEZC	DAD	(23)
PIT	Plasma humano	LLE	LC	MS-MS	(55)
LOVH COM, y otras 2 estatinas	Arroz rojo fermentado	SOE	HPLC LC	DAD MS	(56)
PRAH, LOV, SIM	Estudio de estabilidad	Dilución	HPLC LC	DAD MS	(57)
PRAH,	Aguas residuales	SPE SBSE DLL-ME	HPLC	DAD Q-TOF-MS	(7)

SIMH: Simvastatina en la forma hidroxilácida  
 PRAH: Pravastatina en forma hidroxilácida  
 LOVH: Lovastatina en forma hidroxilácida  
 FLU: Fluvastatina  
 ATO: Atorvastatina  
 LLE: Extracción líquido-líquido  
 UPLC: Cromatografía líquida de ultrarendimiento  
 CE: Electroforesis capilar  
 SBSE: Extracción por sorción en barra de agitación  
 DLLME: Microextracción dispersiva líquido-líquido

LOVL: Lovastatina en forma lactónica  
 SIML: Simvastatina en la forma lactónica  
 COM: Compactina  
 ROS: Rosuvastatina  
 SPE: Extracción en fase sólida  
 SOE: Extracción con disolventes orgánicos  
 HPCE: Electroforesis capilar de alta eficiencia  
 HPTLC: cromatografía en capa fina de alta eficiencia  
 MEKC: Cromatografía capilar electrocinética miceliar

## BIOSÍNTESIS

Las primeras investigaciones efectuadas sobre la biogénesis de las estatinas se enfocaron en las monacolininas J y L mediante el empleo de  $^{14}\text{C}$  marcado y cepas de *Monascus ruber*, sugiriendo que estos compuestos son precursores de la lovastatina y pueden estar clasificados como intermediarios en su biosíntesis. Desde una visión general estos trabajos permitieron demostrar que la monacolina L es la primera estatina sintetizada a partir de nueve unidades acetato y, posteriormente, convertida a monacolina J por una reacción de hidroxilación. Asimismo la monacolina K se deriva de la monacolina J.

La monacolina X, el derivado  $\alpha$ -metil- $\beta$ -cetobutiril éster de la monacolina J, es convertida a lovastatina, mientras que ésta es acumulada en los cultivos de cepas mutantes produciendo cantidades no detectables de lovastatina (9).

Otros estudios han demostrado que la lovastatina L es el precursor de la lovastatina J a través de la acción de un sistema monooxigenasa que envuelve al citocromo P-450, presente en los extractos libres de células de *M. ruber*. Experimentos posteriores, empleando los extractos libres de células del *Monascus* y células vivas de *Paecilomyces viridis*, muestran la transformación de monacolina J a lovastatina. Por otra parte, una combinación de técnicas físicas indican una conversión de la monacolina J en monacolina L, vía un paso que es muy distinto de la síntesis de lovastatina (considerado el  $\alpha$ -metilbutirilester de la monacolina J) (9).

Con respecto a las investigaciones específicas sobre la biogénesis de lovastatina, fueron realizadas en cepas de *Aspergillus terreus* empleando precursores marcados, arrojando como resultado que los pasos biosintéticos inician desde unidades acetato (de 4 y 8C) enlazadas las unas a las otras en modo cabeza cola para formar dos cadenas policétidas. El grupo metilo presente en la cadena lateral o en el C6 de algunas estatinas deriva de la metionina, como ocurre frecuentemente en el metabolismo fúngico, y se inserta en la estructura antes del cierre de los anillos. Este mecanismo demuestra que la mevastatina, la cual carece del grupo  $6\alpha$ -metilo en C6, no es un intermediario en la biosíntesis de la lovastatina. La cadena lateral más grande es entonces ciclada y en ciertas estatinas esterificadas por una cadena lateral en C8. Los átomos de oxígeno presentes en la cadena lateral son insertados, posteriormente, por

una oxidación aeróbica usando un precursor deoxigenado. Estudios sobre la incorporación de  $^{13}\text{C}$  en la lovastatina y la simvastatina hechos sobre cepas de *Penicillium citrinum* y *Monascus ruber*, indicaron una ruta similar, la hidroxilación enzimática y la subsecuente esterificación en C8 también fueron observadas. En la figura 4 está esquematizada la ruta biosintética de la lovastatina (9).

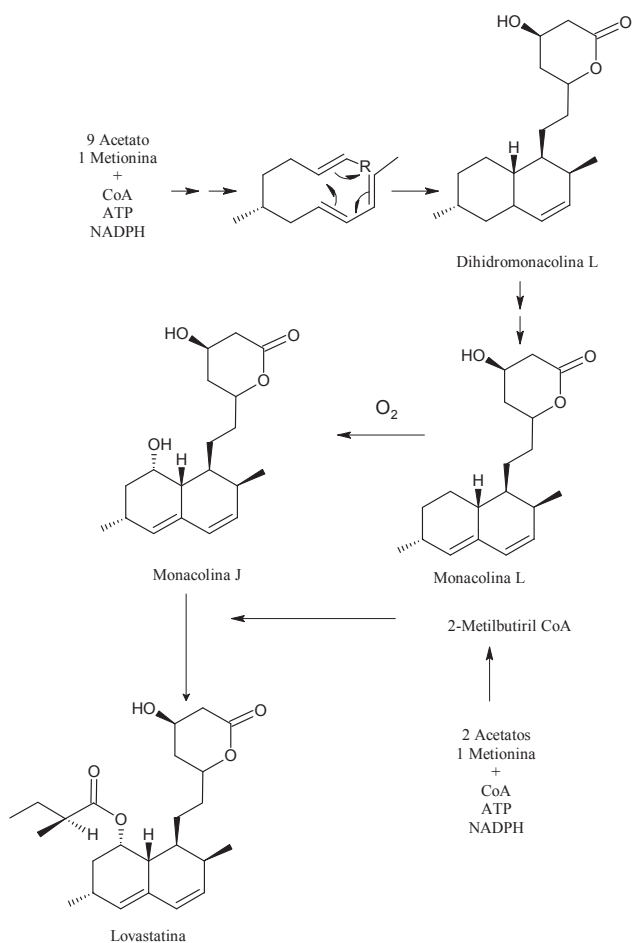


Figura 4. Ruta biosintética de la lovastatina (9).

Investigaciones más recientes se han centrado en el estudio de la cinética enzimática en conjunto con la regulación y la expresión genética implicada en la biosíntesis de estatinas en *A. terreus*. El primer trabajo estudió el mecanismo involucrado en la biosíntesis de lovastatina, particularmente en lo referente a las dos cadenas policétidas. Los resultados incluyen la caracterización de mutantes lov bloqueados en *A. terreus* mostrando que el sistema sintasa policétido multifuncional (PKSs) comprende una lovastatina nonacétido sintasa (LNKS) involucrada en la ciclación de la principal cadena policétida,



para formar el anillo hexahidronaftaleno, y una dicetidosintasa (LDKs) envuelta en la transferencia de la cadena lateral metilbutiril a la monacolina J. Estudios de la estructura primaria de la PKS que forma el nonacétido de la lovastatina han provisto nuevos detalles de su biosíntesis. La caracterización del gen LNKs fue de fundamental importancia para entender cómo los esqueletos carbonados de la dihidromonacolina L y la lovastatina se ensamblan. La LNKs, producida por el gen *lovB*, interactúa con *lovC* (un enoil reductasa putativo), para catalizar las reacciones en la primera parte de la biosíntesis, que conduce a la dihidromonacolina L.

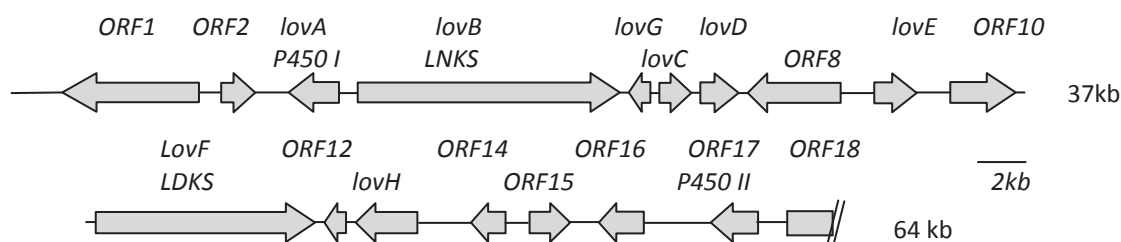
En el paso final la LDKs, hecha por *lovF*, interactúa con *lovD* (enzima transesterasa) que cataliza la fijación del ácido 2-metilbutírico en la monacolina J, derivada desde la monacolina L. Asimismo, se ha dilucidado las principales características de los genes que codifican estas enzimas y los factores reguladores en la producción de lovastatina en *A. terreus*. Una reacción intramolecular Diels-Alder endo cierra el nonacétido para formar un sistema bicíclico con la misma estereoquímica del anillo de la dihidromonacolina L, catalizada por LNKs purificada de *A. nidulans*. Finalmente, en una cepa de *A. terreus*, se investigó los pasos post-PKS envueltos en la biosíntesis de lovastatina, en la cual el gen *lovC* se interrumpe. Estos resultados demuestran que el papel de la proteína *lovC* es asegurar el correcto ensamblaje de la cadena nonacétida en la lovastatina por la proteína *lovB*. En contraste, la construcción de cadena lateral metilbutiril por la LDKs (proteína *lovF*) no requiere la proteína *lovC*. El estudio también demostró que la proteína *lovC* no tiene ninguna función detectable en el proceso post-PKS de la dihidromonacolina L (9). En la figura 5 aparecen los grupos de genes involucrados en la biosíntesis de la lovastatina.

En conclusión, los recientes avances en la clonación de genes han contribuido a la identificación de muchas de las enzimas envueltas en la biosíntesis de lovastatina y han confirmado los pasos biosintéticos hipotetizados en las primeras investigaciones (9).

Además de lo anterior se ha determinado que hay una asociación entre la producción de lovastatina y el crecimiento de *Aspergillus terreus*, al igual que un efecto inhibitorio del nitrógeno orgánico sobre la biosíntesis de la estatina (58). Bizukojc *et al.*, 2007 (59), estudiaron el impacto de suplementar el medio de cultivo de *A. terreus* con vitaminas del grupo B para determinar su efecto sobre la biosíntesis de la forma ácida de la lovastatina. Los investigadores postulan la idea de que como la biosíntesis de lovastatina requiere cantidades importantes de coenzimas en las células, la aplicación de sus precursores en la forma de vitaminas del grupo B podría influenciar positivamente el proceso. Encontraron que en un medio deficiente de nitrógeno, el grupo de vitaminas B, especialmente la nicotinamida, piridoxina y D-pantotenato de calcio, así como una mezcla de ellas con tiamina y riboflavina, aumentan la eficiencia de la biosíntesis de lovastatina. Barrios-González *et al.*, 2010 (60), publicaron una revisión relacionada con la producción biotecnológica y las aplicaciones de las estatinas, en donde se realiza una descripción muy completa de la biosíntesis de la lovastatina y la compactina, especialmente enfocada hacia aspectos bioquímicos y genéticos relacionados con el proceso biosintético.

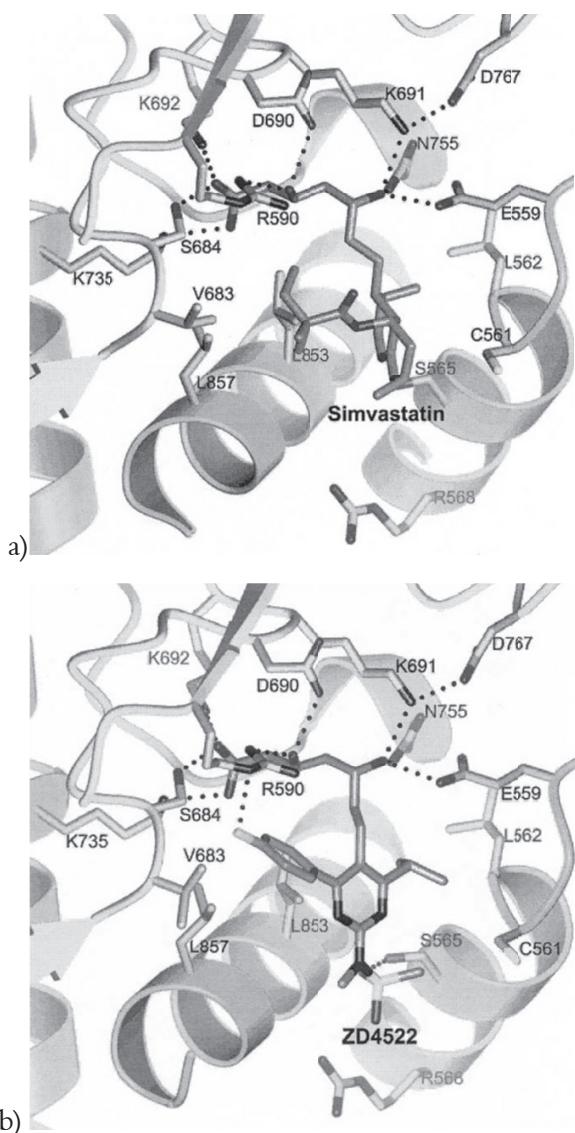
## FARMACOLOGÍA

Todos los inhibidores de la HMG-CoA reductasa funcionan similarmente, por medio de enlaces al sitio activo de la enzima inhibiendo sus funciones. Sus diferencias estructurales están relacionadas con



**Figura 5.** Grupo de genes en la biosíntesis de la lovastatina (*lovB* y *lovF* biosíntesis del policétido; *lovC* enoil reductasa; *lovD* transesterasa; *lovE* y *lovH* genes reguladores; *ORF2* y *ORF17* genes del citocromo P-450; *ORF1* y *ORF10* posibles genes de resistencia; *ORF14* y *ORF16* genes transportadores; *lovG*, *ORF2*, *ORF12*, *ORF15* y *ORF18* funciones desconocidas) (9).

la potencia de inhibición de la enzima. Las estatinas comparten un componente estructural que es muy similar a la porción HMG de la HMG-CoA y todas difieren de ella en que son más voluminosas y más hidrofóbicas. La porción afín con HMG está covalentemente enlazada a un grupo hidrofóbico rígido, el cual va desde muy hidrofóbico (cerivastatina) hasta uno parcialmente hidrofóbico (rosuvastatina). En la figura 6 que corresponde a una ampliación de la imagen por rayos X del complejo enzima-estatina reportado por Istvan, 2003 (6), se resalta las diferencias entre la rosuvastatina clasificada como de tipo II (estatinas sintéticas) y la simvastatina correspondiente al tipo I (estatinas naturales).



**Figura 6.** Acercamiento de la imagen obtenida por rayos X del complejo enzima-estatina en donde se muestran los enlaces de la simvastatina a) y la rosuvastatina b) a la HMG-Coa reductasa (simvastatina  $IC_{50} = 9 \text{ nM}$ ; Rosuvastatina  $IC_{50} = 2 \text{ nM}$ ) (6).

Al comparar las potencias inhibitorias de las dos por sus  $IC_{50}$  se evidencia claramente que la rosuvastatina, al tener un mayor número de interacciones con la enzima, presenta una mayor potencia. En la misma figura las líneas punteadas muestran las interacciones entre la porción afín de las estatinas con la porción HMG de la enzima y se evidencia que éstas son predominantemente iónicas o polares.

Para el caso de las estatinas tipo I hay envueltos numerosos enlaces de hidrogeno, así como interacciones del anillo de la decalina con una hélice de la enzima. En contraste, los grupos metiletil de los inhibidores de tipo II reemplazan funcionalmente el anillo de la decalina y tienen una interacción enlazante adicional entre los grupos fluorofenil y un residuo de la HMG-CoA reductasa. Además de estas interacciones la rosuvastatina y la atorvastatina tienen un puente de hidrogeno con el residuo Ser565 de la enzima, envolviendo un átomo de oxígeno sulfona ( $SO_2R_2$ ) en el caso de la rosuvastatina y un átomo de oxígeno de un carbonilo en el caso de la atorvastatina (6).

## FARMACOCINÉTICA DE LAS ESTATINAS

Cualquier medicamento en general luego de ser consumido por el paciente atraviesa por el proceso de absorción, distribución por los distintos órganos, sistemas o espacios corporales, modificación por procesos químicos y finalmente expulsión.

### Absorción

Todas las estatinas son absorbidas rápidamente luego de su administración, alcanzando las concentraciones máximas plasmáticas a las 4 h (61). Con excepción de la lovastatina y la simvastatina, las cuales son administradas en forma lactónica como prodrugs y deben ser hidrolizadas *in vivo* a la correspondiente forma  $\beta$ -hidroxiácida para tener actividad farmacológica, todas las estatinas son administradas como la forma activa que es la  $\beta$ -hidroxiácida. La ingesta de alimentos tiene efectos variables en la absorción de las estatinas, la cual disminuye la biodisponibilidad para la fluvastatina, pravastatina y atorvastatina. Sin embargo, el efecto hipocolesterolémico no difiere cuando se toma con la cena o antes de acostarse. El tiempo de vida media en el plasma es de 2 a 3 horas para todas las estatinas exceptuando la atorvastatina, que está en el rango entre 14 a 20 horas, por lo que se puede acumular

en el plasma, alcanzando un estado estacionario de concentración después de dosis múltiples (15, 61).

### Distribución

Excepto la pravastatina todas las estatinas se enlazan fuertemente a las proteínas del plasma (principalmente albúmina); por lo tanto, la exposición sistémica a restos de drogas activas no enlazadas es extremadamente baja. Adicionalmente, ya que las estatinas son altamente captadas por el hígado, las interacciones por desplazamiento son también limitadas.

Como resultado del bajo enlazamiento de la pravastatina a las proteínas, la proporción de esta que no está enlazada es 10 veces mayor que la de cualquier otra estatina; sin embargo, generalmente, la amplia distribución tisular es prevenida por las altas propiedades hidrofílicas de la pravastatina (15).

### Metabolismo

Todas las estatinas son metabolizadas por el citocromo P450 (CYP450) y las enzimas (CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, CYP1A2) presentes en el hígado y en el intestino. La pravastatina tiene múltiples pasos metabólicos, por lo tanto decrece la posibilidad de cualquier interacción del medicamento con la enzima CYP-2C9. La fluvastatina es predominantemente metabolizada por el citocromo CYP-2C9 y también por CYP-3A4 y CYP-2C8, y el uso de inhibidores CYP-2C9 es raro. La cerivastatina y atorvastatina son metabolizados en parte por CYP-C3A4, pero si el citocromo está inhibido, podrá ser eliminado por la vía de otros pasos metabólicos con la disminución en la velocidad de degradación. La simvastatina y la lovastatina son exclusivamente dependientes de CYP 3A4 (15). Los metabolitos activos de la atorvastatina extienden su efecto sobre la HMGC<sub>o</sub>A reductasa resultando en tiempos de vida media de 20-30h (61).

### Excreción

Con excepción de la pravastatina todas las estatinas y sus metabolitos son excretados a través de la bilis en las heces después de su metabolismo por el hígado. En consecuencia, la disfunción hepática es un factor de riesgo de miopatía inducida por estatinas y por ende los productores recomiendan tener precaución cuando prescriben estatinas a pacientes con un historial de enfermedades hepáticas (61). La

cantidad de estatinas excretadas en la orina es mínima, excepto la pravastatina la cual está cerca del 20% (15). La pravastatina es eliminada tanto por el riñón como por el hígado principalmente como el fármaco sin alterar. La rosuvastatina también se elimina, en gran parte sin cambios, tanto por el riñón como por el hígado y sus propiedades farmacocinéticas no se alteran en los pacientes con insuficiencia renal leve a moderada (61).

### Toxicología

Las propiedades farmacológicas importantes de las estatinas han conllevado a un estudio muy profundo de sus características y por consiguiente de su toxicidad. En agosto del 2001 se reportó que la cerivastatina causaba varias miopatías y rhabdomiolisis con una inesperada alta frecuencia comparada con otras estatinas de igual o mayor eficiencia, razón por la que fue retirada del mercado (62).

Muchos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa son metabolizados por el hígado. El daño a este órgano es evaluado por un persistente nivel elevado de sus transaminasas, aspartato amino transferasa (ATS) y alanino amino transferasa (ALT). El tratamiento con estatinas comúnmente lleva a un pequeño aumento de ALT. Los niveles de ALT tres veces más altos del límite normal indican en el paciente una potencial disfunción hepática (ictericia colestásica). Más del 5% de los pacientes han mostrado un leve aumento en ATS y ALT a las seis semanas de haber iniciado terapia. La elevación de las transaminasas por encima de los umbrales tóxicos están presentes en 1-2% de los pacientes con tratamiento de estatinas, y los síntomas clínicos dependen de los pacientes. Adicionalmente, la frecuencia de elevación persistente de las transaminasas es consistente con todas las estatinas comercializadas y en dosis dependiente (15). Con la información que en la actualidad está disponible con respecto a la toxicidad de las estatinas en mamíferos, no hay evidencia relativa a un efecto carcinogénico, mutagénico ni tóxico para su reproducción, ni efectos endocrinos, por lo que no pueden ser clasificadas como sustancias con toxicidad potencial crónica de acuerdo a los criterios establecidos en EUA (27).

En la tabla 3 se encuentran resumidas las propiedades farmacocinéticas de las estatinas.

**Tabla 3.** Propiedades farmacocinéticas de las estatinas (61).

	ATO	CER	FLU	LOV	PRA	SIM	ROSU	PITA
Tiempo de dosis óptimo	Cualquier tiempo del día	Tardes	Antes de acostarse	Con comidas en la mañana y la noche	Antes de acostarse	Tardes	Cualquier tiempo del día	na
Biodisponibilidad (%)	12	60	24	5	18	5	20	80
Solubilidad	Lipofílica	Lipofílica	Lipofílica	Lipofílica	Hidrofílica	Lipofílica	Hidrofílica	Lipofílica
Efecto de la comida	Decrece la biodisponibilidad	No afecta	Decrece la biodisponibilidad	Decrece la biodisponibilidad	Decrece la biodisponibilidad	No afecta	No afecta	na
Enlace a proteínas (%)	98	> 99	> 98	> 95	50	95 - 98	90	96
Metabolitos activos	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	Minoritarios	Minoritarios
Tiempo de vida media de eliminación	14	2,5	1,2	3	1,8	2	19	11
Metabolismo de CYP450 e isoenzimas	Sí 3A4	Sí 3A4, 2C8	Sí 2C9	Sí 3A4	No	Sí 3A4	Limitado	Limitado
Excreción renal (5)	< 5	30	6	10	20	13	10	na

ATO: Atorvastatina. CER: Cerivastatina. FLU: Fluvastatina. LOV: lovastatina. PRA: Pravastatina. SIM: Sinvastatina. ROSU: Rosuvastatina. PITA: Pitavastatina. na: no disponibles.

## CONCLUSIONES

Las estatinas, policétidos con variadas acciones biológicas y estructuras químicas diferentes dependiendo de su procedencia comparten un componente estructural que es muy similar a la porción HMG de la HMG-CoA, lo que les permite que actúen como hipocolesterolémicas por inhibición de la HMG-CoA reductasa. La identificación de las estatinas en formulaciones farmacéuticas y en matrices biológicas requiere de diferentes procedimientos experimentales que incluyen para su extracción LLE, SPE y SOE, siendo esta última la de más amplio empleo. Dentro de las técnicas de separación se emplean HPLC y CG, donde la primera de ellas es la más empleada, prevaleciendo la utilización de separaciones en fase reversa y el uso de detectores UV y DAD, aunque existen técnicas de aplicación más restringida como las titulaciones indirectas y la espectrometría de masas séxtuple ( $MS^1$ - $MS^6$ ). En cuanto a su farmacocinética, todas las estatinas se absorben rápidamente, con un tiempo de vida media en el plasma entre 2 a 3 horas, exceptuando la atorvastatina. Su efecto hipocolesterolémico no difiere cuando son tomadas con la cena o antes de acostarse. Estudios de su toxicidad en mamíferos han demostrado que no hay evidencia de efecto carcinogénico, mutagénico ni tóxico.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen tanto a la División de Investigación de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, como al CODI, Convocatoria Estrategia de sostenibilidad 2013-2014 de la Universidad de Antioquia, por la financiación para la elaboración de esta revisión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol.* 2005 Aug; 45: 89-118.
- Almuti K, Rimawi R, Spevack D, Ostfeld RJ. Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. *Int J Cardiol.* 2006 Apr; 109 (1): 7-15.
- Moore RN, Bigam G, Chan JK, Hogg AM, Nakashima TT, Vederas JC. Biosynthesis of the Hypocholesterolemic Agent Mevinolin by *Aspergillus terreus*. Determination of the Origin of Carbon, Hydrogen, and Oxygen Atoms by  $^{13}C$  NMR and Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc.* 1985 Jun; 107 (12): 3694-3701.
- Gunde-Cimerman N, Friedrich J, Cimerman A, Benicki N. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993 Aug; 111 (2-3): 203-206.
- Endres M. Statins: Potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler Suppl.* 2006 Apr; 7 (1): 31-35.
- Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atheroscler Suppl.* 2003 Mar; 4 (1): 3-8.
- Martín J, Buchberger W, Alonso E, Himmelsbach M, Aparicio I. Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. *Talanta.* 2011 Jul; 85 (1): 607-615.



8. Nirogi R, Mudigonda K, Kandikere V. Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 Jun; 44 (2): 379-387.
9. Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biot.* 2002 Apr; 58 (5): 555-564.
10. Kim HJ, Lee I-S, Kang SS. Cholesterol biosynthesis inhibitors of microbial origin. *Studies in Nat Prod Chem.* 2006; 33: 751-784.
11. Endo A, Hasumi K, Nakamura T, Kunishima M, Masuda M. Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. *J Antibiot.* 1985 Jul; 38 (3): 321-328.
12. Dhale MA, Divakar S, Kumar SU, Vijayalakshmi G. Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties. *Appl Microbiol Biot.* 2007 Oct; 73 (5): 1197-1202.
13. Zhuge B, Fang HY, Yu H, Rao ZM, Shen W, Song J, et al. Bio-conversion of lovastatin to a novel statin by *Amycolatopsis sp.* *Appl Microbiol Biot.* 2008 Mar; 79 (2): 209-216.
14. Masana L. Pitavastatin – from clinical trials to clinical practice. *Atheroscler Suppl.* 2010 Dec; 11 (3): 15-22.
15. R.Veillard N, Mach F. Review Statins: the new aspirin? *Cell Mol Life Sci.* 2002 Sep; 59 (11): 1771-1786.
16. Jia C-Y, Yin Q-X, Gong J-B, Wang J-K. Solubility of Form A Pravastatin Sodium in Aqueous 2-Propanol Mixtures. *J Chem Eng Data.* 2009 Dec; 54 (1): 154-156.
17. Nti-Gyabaah J, Chiew YC. Solubility of Lovastatin in Ethyl Acetate, Propyl Acetate, Isopropyl Acetate, Butyl Acetate, sec-Butyl Acetate, Isobutyl Acetate, tert-Butyl Acetate, and 2-Butanone, between (285 and 313) K. *J Chem Eng Data.* 2008 Aug; 53 (9): 2060-2065.
18. Eksangsri T, Habaki H, Kawasaki J. Extraction of compactin (ML-236B): equilibrium distribution in water ethyl acetate system. *Chem Eng Process.* 2004 Dec; 43 (10): 1203-1210.
19. Lee C-L, Hung H-K, Wang J-J, Pan T-M. Improving the Ratio of Monacolin K to Citrinin Production of *Monascus purpureus* NTU 568 under *Dioscorea* Medium through the Mediation of pH Value and Ethanol Addition. *J Agric Food Chem.* 2007 Jul; 55 (16): 6493-6502.
20. Erturk S, Onal A, Cetin SM. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr B.* 2003 Apr; 793 (2): 193-205.
21. Pansuriya RC, Singhal RS. Supercritical Fluid Extraction of Lovastatin from the Wheat Bran Obtained after Solid-State Fermentation. *Food Technol Biotech.* 2009 Jul; 47 (2): 159-165.
22. Damic M, Nigovic B. Fast Analysis of Statins in Pharmaceuticals by MEKC. *Chromatographia.* 2010 Dec; 71 (3-4): 233-242.
23. Nigovi B, Vegar I. Capillary Electrophoresis Determination of Pravastatin and Separation of Its Degradation Products. *Croat Chem Acta.* 2008 Mar; 81 (4): 615-622.
24. Kocijan A, Grahek R, Bastarda A, Kralj LZ. Fast analysis of pravastatin in production media. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Jun; 822 (1-2): 311-315.
25. Yuan H, Wang F, Tu J, Peng W, Li H. Determination of lovastatin in human plasma by ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Dec; 46 (4): 808-813.
26. Jun-Jun H, Bi-Yun H, Hong J, Mu Y. Mass Spectrum Characterization of Monacolin J (MS1-MS6). *J Chin Mass Spec Soc.* 2009; 30 (3): 154-159.
27. Hernando MD, Agüera A, Fernández-Alba AR. LC-MS analysis and environmental risk of lipid regulators. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Sep; 387 (4): 1269-1285.
28. Novakova L, Satinsky D, Solich P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *Trac-Trend Anal Chem.* 2008 Apr; 27 (4): 352-368.
29. Tharpa K, Basavaiah K. Bromatometric Assay of Simvastatin in Pharmaceuticals. *J Anal Chem+.* 2009 Mar; 64 (11): 1193-1198.
30. Li Y-G, Zhang F, Wang Z-T, Hu Z-B. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed.* 2004 Jun; 35 (5): 1101-1112.
31. Millership JS, Chin J. Determination of Simvastatin in Tablet Formulations by Derivative UV Spectrophotometry. *J Anal Chem.* 2010 Jun; 65 (2): 164-168.
32. Pasha K, Muzceb S, Basha SJS, Shashikumar D, Mullangi R, Srinivas NR. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors-atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and in vitro metabolism studies. *Biomed Chromatogr.* 2006 Jun; 20 (3): 282-293.
33. Gomes FP, García PL, Alves JMP, Singh AK, Kedor-Hackmann ERM, Santoro MIRM. Development and Validation of Stability-Indicating HPLC Methods for Quantitative Determination of Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, and Rosuvastatin in Pharmaceuticals. *Anal Lett.* 2009 Apr; 42: 1784-1804.
34. Gunde-Cimerman N, Plemenita A, Cimerman A. A hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor synthesized by yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* 1995 Jul; 132 (1-2): 39-43.
35. Manzoni M, Rollini M, Bergomi S, Cavazzoni V. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. *Biotechnol Tech.* 1998 Jul; 12 (7): 529-532.
36. Manzoni M, Bergomi S, Rollini M, Cavazzoni V. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett.* 1999 Feb; 21 (3): 253-257.
37. Ye LY, Firby PS, Moore MJ. Determination of Lovastatin in Human Plasma Using Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography With UV Detection. *Ther Drug Monit.* 2000 Aug; 22 (6): 737-741.
38. Chang Y-N, Huang J-C, Lee C-C, Shih I-L, Tzeng Y-M. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme Microb Tech.* 2002 Jan; 30 (7): 889-894.
39. López JLC, Pérez JAS, Sevilla JMF, Fernández FGA, Grima EM, Chisti Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb Tech.* 2003 May; 33 (2-3): 270-277.
40. Rajh SJ, Kreft S, Strukelj B, Vrečer F. Comparison of CE and HPLC Methods for Determining Lovastatin and Its Oxidation Products after Exposure to an Oxidative Atmosphere. *Croat Chem Acta.* 2003 May; 76 (3): 263-268.
41. Miao X-S, Metcalfe CD. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2003 Apr; 998 (1-2): 133-141.
42. Alarcón J, Águila S. Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*: effects of the C:N ratio. *Z Naturforsch C.* 2006 Jan-Feb; 61 (1-2): 95-98.
43. Alarcón J, Águila S, Arancibia-Avila P, Fuentes O, Zamorano-Ponce E, Hernández M. Production and Purification of Statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) Strains. *Z Naturforsch C.* 2003 Jan-Feb; 58 (1-2): 62-64.
44. Meyyanathan S, Ramasarma G, Suresh B. Análisis de la simvastatina en preparaciones farmacéuticas mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento. *Ars Pharm.* 2004; 45 (2): 121-129.
45. Chen F, Hu X. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin. *Int J Food Microbiol.* 2005 Mar; 103 (3): 331- 337.



46. Xu B-J, Wang Q-J, Jia X-Q, Sung C-K. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2005; 10 (1): 78-84.
47. Lai L-ST, Tsai T-H, Wang TC, Cheng T-Y. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Enzyme Microb Tech*. 2005 Apr; 36 (5-6): 737-748.
48. Barrett B, Huclová J, Borek-Dohalský V, Nemeč B, Jelínek I. Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2003 May; 32 (3): 517-526.
49. Valera HR, Gomes J, Lakshmi, Gururaja R, Suryanarayan S, Kumar D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. *Enzyme Microb Tech*. 2005 Oct; 37 (5): 521-526.
50. Bauer S, Mwinyi J, Stoeckle A, Gerloff T, Roots I. Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Apr; 818 (2): 257-262.
51. Yang D-J, Hwang LS. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in *Pu-Erh* tea. *J Chromatogr A*. 2006 Jun; 1119 (1-2): 277-284.
52. Porcel ER, López JLC, Ferrón MAV, Pérez JAS, Sánchez JLG, Chisti Y. Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *Aspergillus terreus*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2006 Jun; 29 (1): 1-5.
53. Bizukojc M, Ledakowicz S. A macrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 2007 Jul; 130 (4): 422-435.
54. Shaligram NS, Singh SK, Singhal RS, Szakacs G, Pandey A. Compactin production in solid-state fermentation using orthogonal array method by *P. brevicompactum*. *Biochem Eng J*. 2008 Oct; 41 (3): 295-300.
55. Shen-Tu J, Xu X, Liu J, Hu X, Chen J, Wu L, et al. Determination of Pitavastatin in Human Plasma by LC-MS-MS. *Chromatographia*. 2009 May; 69 (9-10): 1041-1047.
56. Chairote E-O, Lumyong S, Chairote G. Study on cholesterol lowering compounds in red yeast rice prepared from thai glutinous rice. *As. J Food Ag-Ind*. 2010; 3 (2): 217-228.
57. Piecha M, Sarakha M, Trebse P, Kocar D. Stability studies of cholesterol lowering statin drugs in aqueous samples using HPLC and LC-MS. *Environ Chem Lett*. 2010; 8 (2): 185-191.
58. Bizukojc M, Ledakowicz S. Simultaneous biosynthesis of (+)-geodin by a lovastatin-producing fungus *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 2007 Jul; 132 (4): 453-460.
59. Bizukojc M, Pawlowska B, Ledakowicz S. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*. 2007 Jan; 127 (2): 258-268.
60. Barrios-González J, Miranda RU. Biotechnological production and applications of statins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Oct; 85 (4): 869-883.
61. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. 2004 Aug; 19 (1): 117-125.
62. Gelissen IC, Browmn AJ. Drug targets beyond HMG-CoA reductase: Why venture beyond the statins?. *Front Biology*. 2011 Jan; 6 (3): 197-205.

## EVALUADORES

El Comité Editorial expresa sus agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la evaluación de los manuscritos puestos a consideración para ser publicados en la Revista Vitae Volumen 20 N° 1.

**Carlos Julio Montoya Guarín MD, M.Sc., D.Sc.**

Grupo de Investigación Inmunovirología  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia

**Daniel Savater Ph.D.**

Grupo de Investigación en Atención Farmacéutica  
Universidad de Granada  
Granada, España

**Juan Francisco León Oyola Ph.D.**

Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio  
González”  
Universidad de la Laguna

**Felix Daniel Andueza Leal Ph.D.**

Microbiología y Parasitología  
Universidad de los Andes  
Mérida, Venezuela

**Fernando Ramos Ph.D.**

Bromatology, Pharmacognosy and Analytical  
Sciences Group  
Coimbra University  
Coimbra, Portugal

**Francisco Gutiérrez Esp.**

Grupo de Investigación CENTAURO  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia

**Gabriela Delgado Murcia Ph.D.**

Grupo de Investigación de Inmunotoxicología  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, Colombia

**Juan Diego Torres Oquendo Ph.D.**

Grupo de Investigación en Análisis Sensorial  
Universidad de Antioquia  
Medellín, Colombia

**Rafael Díaz Sobac Ph.D.**

Instituto de Ciencias Básicas  
Universidad Veracruzana  
Xalapa, Veracruz, México

**Lilian Sibelle Campos Bernades Ph.D.**

Grupo Análise e Desenvolvimento de Fármacos  
de Origem Natural  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Florianópolis, Brasil

**William Albarracín Hernández Ph.D.**

ICCTA  
Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, Colombia