



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS**  
MÉRIDA-VENEZUELA



ISSN 0543-517-X  
Depósito Legal pp 1958 02  
ME 1003

# REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

FUNDADA EN 1958



"REVISTA PATRIMONIO ULA"

**Volumen 64, Número 2**  
**julio-diciembre 2022**

## EDITORIAL

Nunca como hoy la difusión del conocimiento había sido tan universal, inmediata y pertinente. La revolución tecnológica pone en manos de los especialistas (y del lego) todo aquello que es producción científica, y no discrimina. Los linderos del saber, que hasta hace pocas décadas eran coto cerrado a favor de una élite de iniciados, hoy se derrumban, y de la mano de las revistas (entre otras herramientas académicas) tocan las puertas de aquellos interesados en conocer algo nuevo, o en renovar los pertrechos del intelecto.

La Razón Ilustrada que yace como herencia de siglos, hoy está en manos de muchos, y esto hace de la ciencia un fenómeno transdisciplinario, que busca referentes más allá de las parcelas y los feudos científicos tradicionales, para otear nuevos horizontes.

Obviamente, el papel de las revistas científicas continúa siendo determinante en medio de un mundo multifactorial y complejo, y su impronta será siempre difundir los productos de la criba del método científico, y que esto se traduzca en beneficio para la humanidad. La *Revista de la Facultad de Farmacia* tiene experiencia en este derrotero, y su público “cautivo” se agiganta gracias al mundo digital, pero también su responsabilidad. Empero, nunca la ha eludido; de allí su vigencia y su dilatada historia.

### **Prof. Dr. Ricardo Gil Otaiza**

Departamento de Farmacognosia y Medicamentos

Orgánicos

Facultad de Farmacia y Bioanálisis

Universidad de Los Andes

## CONTENIDO ARTÍCULOS ORIGINALES

Desarrollo y validación de una metodología para el control de calidad microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos.

### **Development and validation of methodology for microbiological quality control of phytopharmaceuticals and phytomedicines.**

*Autores: Rojas-Gelves Clody, Pérez-Colmenares Alida...*  
.....3

Disbiosis cervico-vaginal en la pesquisa citológica de cáncer de cuello uterino.

### **Cervico-vaginal dysbiosis in cytological screening for cervical cancer.**

*Autores: Erazo-Nieto Greca, Toro de Méndez Morelva.*  
.....11

Estudio fitoquímico preliminar, evaluación de las actividades antioxidante y ecotóxica de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L (SOLANACEAE).

### **Preliminary phytochemical study, evaluation of the antioxidant and ecotoxic activities of methanolic extracts from the aerial parts of *Physalis peruviana* L (SOLANACEAE).**

*Autores: Contreras Carlos, Morillo Marielba, Visbal Tomas*.....27

Distribución del contenido de cadmio en los diferentes componentes de cigarrillos comercializados en Venezuela después de fumados.

### **Distribution of cadmium content in the different components of cigarettes marketed in Venezuela after smoking.**

*Autores: Guillén Juan Carlos, Petit de Peña Yaneira, Vicuña-Fernández Nelson, Briceño Luisa Carolina*.....38

**Normas Editoriales**.....53

**Reglamento para el Arbitraje**.....54

**Índice Acumulado**.....56

Artículo original

# Desarrollo y validación de una metodología para el control de calidad microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos.

Development and validation of methodology for microbiological quality control of phytopharmaceuticals and phytomedicines.

Rojas-Gelves Clody<sup>1\*</sup>, Pérez-Colmenares Alida<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela.

Recibido: julio de 2022–Aceptado: septiembre de 2022

## RESUMEN

Se desarrolló y validó un método microbiológico para el control de calidad de fitofármacos y fitomedicamentos con el fin de cuantificar bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras, así como cualificar microorganismos específicos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*) considerados microbiota objetable dentro de los criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles. Se realizaron pruebas preliminares para determinar el límite de detección, repetibilidad, reproducibilidad/eficacia relativa/ recuperación y control ambiental. Así mismo se verificó el método a través de las pruebas de promoción de crecimiento y aptitud del método de recuento, preparación de cepas de prueba, promoción del crecimiento de los medios, controles negativos e indicadores en medios sólidos. Se determinaron los parámetros de validación para la evaluación cuantitativa (especificidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y detección, robustez y tolerancia), al igual que los parámetros de evaluación cualitativa (especificidad, límite de detección, tolerancia y robustez). Los resultados demostraron que el método ensayado es específico,

tiene sensibilidad, tolerancia y robustez constituyendo una alternativa para el análisis microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos.

## PALABRAS CLAVE

Validación, fitofármacos, fitomedicamentos, método microbiológico, control de calidad.

## ABSTRACT

A microbiological method was developed and validated for quality control of phytopharmaceuticals and phytomedicines in order to quantify mesophilic aerobic bacteria, molds and yeasts and qualifying specific microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*) considered objectionable microbiota within the acceptance criteria for the microbiological quality of non-sterile pharmaceutical forms. Preliminary tests were performed to determine detection limit, repeatability, reproducibility/relative efficiency/recovery, and environmental control. Likewise, the method was verified through the growth promotion and suitability counting method, preparation of test strains, media growth promotion, negative controls and solid media

indicators. The validation parameters for the quantitative evaluation (specificity, accuracy, precision, quantification and detection limit, robustness and tolerance) were determined, as well as the qualitative evaluation parameters (specificity, detection limit, tolerance and robustness). The results showed that tested method is specific, has sensitivity, tolerance and robustness, representing an alternative for the microbiological analysis of phytopharmaceuticals and phytomedicines.

## KEY WORDS

Validation, phytomedicines, phytopharmaceuticals, microbiological method, quality control.

## INTRODUCCIÓN

Los métodos clásicos o tradicionales utilizados para el control microbiológico de medicamentos fueron desarrollados hace más de un siglo y se continúan utilizando ya que cumplen con su función de enumerar e identificar microorganismos, contribuyendo a controlar la seguridad microbiológica de los productos farmacéuticos [1]. La definición analítica de validación es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y a los atributos de calidad previamente establecidos [2]. Es fundamental el uso de métodos validados en cualquier sistema de calidad. En particular, la validación de los métodos microbiológicos por la propia naturaleza de los organismos vivos, los cuales muestran una considerable capacidad de variaciones genéticas y mutaciones [3].

Los análisis microbiológicos tienen características distintas de los análisis físicos y químicos, con sus intrínsecas fuentes de variabilidad en los resultados, aspectos que traen dificultades en el establecimiento de líneas normativas en los ensayos [4]. En tal sentido, es necesario establecer un protocolo de validación que

permita especificar los requisitos y condiciones que debe cumplir un método microbiológico siguiendo las pautas establecidas en los textos oficiales para productos no estériles, evaluando las pruebas preliminares y verificando el desempeño del método en estudio, para asegurar que no existe algún factor que influya en la detección del organismo de interés [5]. Los parámetros críticos a evaluar son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad y rango, robustez y equivalencia; su determinación dependerá de la categoría del ensayo: cualitativo/cuantitativo [1].

Se realizó el desarrollo y validación una metodología siguiendo como referencia las pautas del procedimiento de la USP 41 en lo relativo a la evaluación de productos no estériles, ya que no existe un método específico para los ensayos microbiológicos de fitofármacos y fitomedicamentos sino que se indican son procedimientos para suplementos dietéticos, siendo los límites mayores que los permitidos para productos farmacéuticos no estériles. [5].

El término fitofármaco no debe confundirse con el de planta medicinal, al respecto, se ha precisado su significado en los términos siguientes: “Son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entienden: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante”. Mientras que fitomedicamentos entonces son un extractos vegetales estandarizados (fitofármacos), normalizado y estabilizado y del cual se conoce una acción farmacológica definida y cuantificada, fabricado con tecnología farmacéutica moderna y que su utilización terapéutica está basada en resultados obtenidos de estudios clínicos diseñados y desarrollados de acuerdo con criterios internacionales [6].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la buena salud es esencial para el desarrollo económico y social sostenido y la reducción de la pobreza. El acceso a servicios básicos de salud es crucial para el mantenimiento y mejoramiento de la salud. Al mismo tiempo, es

preciso evitar que las personas se empobrezcan a causa de sus gastos sanitarios. Los objetivos de la estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 consisten en: aprovechar la posible contribución de la Medicina Tradicional y Complementaria (MTC) a la salud, el bienestar, la atención de salud centrada en la persona y la cobertura sanitaria universal; así como promover la utilización segura y eficaz de la MTC mediante la reglamentación, investigación e integración de sus productos, prácticas y profesionales en los sistemas de salud, según proceda. La estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 está concebida para ayudar a los países a determinar la mejor manera de promover la salud y proteger a los usuarios que desean recurrir a esos productos, prácticas y profesionales. [7].

La presente investigación permitió desarrollar y validar una metodología para el control de calidad microbiológico de fitofármacos y fitomedicamentos, en la cual se varió la matriz (medio de cultivo) en referencia a los métodos oficiales para productos no estériles, los resultados obtenidos son fundamentales para gestionar el sistema de calidad correspondiente al análisis de material de origen vegetal (polvos) y diversas formas farmacéuticas (jarabes y cápsulas) de productos naturales, demostrándose que el método es específico, preciso, tiene sensibilidad, tolerancia y robustez.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas bacterianas:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 obtenidas por donación de Laboratorios Farmacéuticos regionales, *Salmonella typhi* CDC 57 CVCM495.

**Medios de cultivo:** Caldo Digerido Caseína y Soja + polisorbato, Caldo Letheen, Agar Letheen, Agar digerido Caseína y Soja + polisorbato, Agar Manitol Salado, Agar Baird Parker, Agar MacConkey, Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno, Agar Cetrinida, Agar con Sulfito de Bismuto Los medios de cultivo utilizados son de marcas Merck, HIMEDIA, BD y Sharlau.

**Fitofármacos y fitomedicamentos evaluados:** Alcachofa y Zarparrilla material vegetal polvo.

Alcachofa y Zarparrilla cápsulas. Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes). Las muestras fueron adquiridas en una farmacia de la región.

**Proceso de validación:** Se realizaron las pruebas preliminares del método, para garantizar la confiabilidad de los resultados y cumplir con los requisitos previos de validación, determinando los siguientes parámetros:

- a) **Límite de detección, Repetibilidad (R):** la determinación se llevó a cabo verificando la medición de la temperatura (30 °C y 37 °C) de dos modelos de incubadoras ubicadas en diferentes laboratorios. Se evaluaron posibles cambios de temperatura antes, durante y después del análisis microbiológico de los fitofármacos y fitomedicamentos evaluados. Esta prueba permitió corroborar el grado de concordancia entre resultados sucesivos e independientes obtenidos por el mismo método empleando un material idéntico bajo las mismas condiciones. De este modo, también se realizó la verificación del desempeño del equipo para su uso previsto.
- b) **Reproducibilidad, Eficacia Relativa (ER)/Recuperación:** se realizó el análisis de pruebas preparatorias con las muestras (material vegetal polvo, producto cápsulas y jarabes) inoculadas con cultivos viables de *Escherichia coli*, ya que, este es el microorganismo considerado objetable en formas farmacéuticas no estériles acuosas o no acuosas vía oral según los criterios de aceptación para preparaciones farmacéuticas establecidos en la Farmacopea de los Estados Unidos 41 (por sus siglas en inglés, USP 41), esta prueba permitió comprobar que el producto evaluado no origina inhibición en el crecimiento del microorganismo [5].
- c) **Sensibilidad Relativa (SR)/Inclusividad:** en esta prueba se observó la capacidad del método para detectar el analito verificando cepas y medios de cultivo, trabajando con las cepas de prueba con un número no mayor a 100 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (U.F.C/mL), por diferentes técnicas de análisis (estría en placa, punción en tubo), se realizaron pruebas de especificidad de cada uno de los microorganismos con el medio de cultivo

selectivo para su crecimiento, pruebas específicas como tinción de Gram y confirmatorias para comprobar la presencia o ausencia, de acuerdo a las características de crecimiento observadas. Los microorganismos, medios selectivos y pruebas confirmatorias fueron los siguientes: *Staphylococcus aureus*: Agar Manitol Salado y Baird Parker, prueba confirmatoria coagulasa, tinción de Gram. *Escherichia coli*: Agar MacConkey prueba confirmatoria Agar Levine con Eosina-Azul de Metileno, tinción de Gram. *Pseudomonas aeruginosa*: Agar Cetrimida, prueba confirmatoria oxidasa y tinción de Gram. *Salmonella typhi*: Agar con Sulfito de Bismuto, prueba confirmatoria de Kligler y tinción de Gram.

- d) Control ambiental: se realizó control ambiental como un parámetro de punto crítico de evaluación durante la ejecución de los análisis microbiológicos y parámetros de validación. Los ambientes evaluados fueron los mesones de trabajo de dos laboratorios usados Salón A2 y preparación de medios del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, respectivamente. El control atmosférico se llevó a cabo por monitoreo pasivo por el método de sedimentación por 1 hora. Luego de la exposición de las placas en el ambiente indicado se realizó la incubación de las mismas de forma invertida a 30 °C por 48 horas. Simultáneamente se hizo toque de dedos por parte del analista, luego de la impronta se procedió a la incubación de las placas de forma invertida a 30 °C por 48 horas. Este control ambiental permitió verificar las condiciones asépticas necesarias para la manipulación de las muestras y el desarrollo del método, así como la limpieza de las áreas de trabajo de los laboratorios.

**Verificación de desempeño del método.** Para verificar el desempeño del método con respecto al recuento microbiano cuali-cuantitativo se realizaron las siguientes pruebas:

- a) Prueba de promoción del crecimiento y aptitud del método de recuento: se realizó la inoculación del producto a evaluar (alcachofa y zarzaparrilla producto cápsulas, alcachofa y

zarzaparrilla material vegetal polvo y jarabes de *Hedera hélix* de dos marcas comerciales diferentes) con concentraciones conocidas de *Escherichia coli* (10-7). Las muestras fueron preparadas en una dilución 1 en 10 (10 mL ó 10 g en 90 mL de diluyente) en Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato y en Caldo Lethen (diluyentes) (variable del medio con respecto al establecido en la USP 41). La preparación de las muestras, inoculación y dilución, se llevó a cabo con el fin de determinar la solubilidad y apariencia de las mismas en los medios de cultivo seleccionados y verificar que el producto no tiene propiedades que inhiben el crecimiento del microorganismo inoculado.

- b) Preparación de las cepas: el mantenimiento y conservación de las cepas se efectuó siguiendo el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) interno del laboratorio sobre el manejo y repique de cepas, se prepararon diluciones de cada uno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (10-7), *Escherichia coli* (10-7), *Pseudomonas aeruginosa* (10-7), *Salmonella typhi* (10-7).
- c) Promoción del crecimiento de los medios: se preparó Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato y Caldo Lethen (diluyentes) (variable del medio con respecto al establecido en la USP 41) y se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo de los microorganismos: *Staphylococcus aureus* (10-7), *Escherichia coli* (10-7), *Pseudomonas aeruginosa* (10-7), *Salmonella typhi* (10-7). Además se realizó el control negativo del medio de cultivo, agregando 90 mL de cada medio en frascos de vidrio estéril y se incubaron a 30-35 °C por 48 horas. El objetivo de esta prueba fue observar el crecimiento de los diferentes microorganismos evaluados mediante la turbidez de los medios de cultivo inoculados y en el caso de los controles negativos no se debe visualizar crecimiento (turbidez).
- d) Propiedades inhibitorias de los medios: se analizaron los medios de cultivo preparados para verificar que las propiedades son adecuadas, para lo cual se inoculó Agar Cetrimida con el microorganismo de inhibición *Escherichia coli* (10-7) y Agar MacConkey con

*Staphylococcus aureus* (10-7), se incubó a la temperatura especificada de 37 °C durante un tiempo no menor de 48 horas tiempo indicado en la prueba. No se observó crecimiento característico del microorganismo ya que no son los medios selectivos para cada microorganismo seleccionado, para cumplir con el objetivo de la prueba de inhibición.

**Desarrollo del método microbiológico.** El análisis microbiológico de Alcachofa y Zarparrilla material vegetal polvo, Alcachofa y Zarparrilla Cápsulas y Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes). El proceso de validación se estableció en base al análisis de productos no estériles mediante dos tipos de métodos, uno cuantitativo (determinación de un valor numérico de microorganismos expresados como U.F.C) y otro cualitativo (detección de ausencia o presencia de microorganismos) [8].

**Parámetros validados del método cuantitativo:**

a) **Evaluación del diluyente:** permitió comprobar que los medios utilizados no interfieren en el proceso de recuperación microbiana, se utilizaron dos diluyentes: Caldo Lethen (variable del método, medio diluyente a validar) y el Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato (referido por la USP 41). Se realizó el siguiente procedimiento: Se prepararon 5 tubos con 9 mL para cada uno de los diluyentes y se inoculó con 1 mL de la cepa de prueba (*Staphylococcus aureus* 10-7), en su respectiva dilución de trabajo (100 UFC/mL). Luego se colocó por duplicado 1 mL de cada tubo a placas de Petri estériles y luego se incorporaron 15 mL de Agar Digerido Caseína y Soja y Agar Lethen previamente fundido y enfriado a 45 °C aproximadamente, se mezcló la muestra con el agar rotando suavemente la placa. Luego se incubaron las placas a 35 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias, para determinar si el recuento obtenido es similar entre ambos y si el diluyente a validar cumple con los parámetros del diluyente estándar. Después del periodo de incubación se llevó a cabo el tratamiento estadístico estableciendo la media, desviación estándar, varianzas

homogéneas, la *t de student* para evaluar pares de resultados.

- b) **Especificidad y Exactitud:** mediante esta prueba la especificidad indica la capacidad para detectar un panel de microorganismos aptos para demostrar que el método funciona para el objetivo propuesto, mientras que la exactitud se refiere a la proximidad de los resultados del método de prueba respecto a los obtenidos por el método oficial. La especificidad y exactitud se establecieron tomando en cuenta el Caldo Lethen (neutralizante Lecitina) + producto Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes) y Caldo Digerido de Caseína y Soja + polisorbato (neutralizante) + producto Jarabe a base de *Hedera hélix* (2 marcas comerciales diferentes). Se inocularon con 1 mL de la cepas de prueba por separado (*Staphylococcus aureus* 10-7, *Pseudomonas aeruginosa* 10-7, *Escherichia coli* 10-7, *Salmonella typhi* 10-7). Al finalizar la incubación, se contaron las U.F.C. y se determinó la media, desviación estándar y los porcentajes de recuperación bacteriana.
- c) **Precisión:** se refiere al grado de coincidencia entre los resultados de las pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestreos múltiples de suspensiones de microorganismos de laboratorio a lo largo del intervalo de la prueba. La precisión de un método microbiológico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). Se realizó el cálculo de coeficiente de variación, con los datos obtenidos en el parámetro de especificidad y exactitud como son: media, desviación estándar y los cálculos de los porcentajes de recuperación bacteriana.
- d) **Límite de Cuantificación y Detección:** indica el número más bajo de microorganismos que pueden contarse con exactitud, mientras que el límite de detección es el número más bajo de microorganismos en una muestra que puede detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas [5]. Estos parámetros están implícitos en la verificación de desempeño del método, a través de la preparación de cepas y pruebas de promoción de crecimiento. Para la

determinación se preparó la dilución mínima de cada cepa de prueba que permite inocular aproximadamente 5 UFC/mL. Se prepararon 3 tubos conteniendo 9 mL de medio (Caldo Lethen) + producto (alcachofa y zarzaparrilla cápsulas) y 3 tubos conteniendo 9 mL de medio para cada microorganismo de prueba, se inoculó 0,5 mL de una dilución posterior a la dilución de trabajo, luego se colocó 1 mL de cada tubo por duplicado en placas de Petri estériles y se añadió 15 mL del medio de cultivo Agar Digerido de Caseína y Soja + polisorbato y se incubó a 35 °C por 48 horas.

- e) **Tolerancia:** es el grado de precisión de los resultados de la prueba obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras bajo diversas condiciones, tales como el empleo de analistas, instrumentos, lotes de reactivos y laboratorios diferentes [5]. La tolerancia se evaluó observando la variación de crecimiento en los dos medios de cultivo evaluados (Agar Digerido Caseína y Soja + neutralizantes y en el Agar Lethen), para la determinación (cuantificación) de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) y porcentaje de recuperación.
- f) **Robustez:** es la medida de la capacidad del método para no ser afectado por variaciones pequeñas, representa un indicador de la confiabilidad [5]. La robustez fue determinada usando un inóculo de cada una de las cepas de prueba, en el Agar Digerido Caseína y Soja + neutralizantes y en el Agar Lethen (variable del método, medio diluyente a validar).

#### **Parámetros validados del método cualitativo:**

- a) **Especificidad:** se estableció mediante el crecimiento característico positivo en el agar específico cuando se inoculó la cepa correspondiente y negativo cuando se inoculó en el mismo agar, la cepa no específica. Por ejemplo el crecimiento de *Escherichia coli* positivo en el Agar MacConkey y negativo cuando se inocula en Agar Manitol Salado.
- b) **Límite de Detección:** se evaluó realizando una siembra de *Escherichia coli* en el Agar MacConkey y de *Salmonella typhi* en el medio selectivo Agar con Sulfito de Bismuto.
- c) **Tolerancia:** se determinó este parámetro utilizando 2 lotes y marcas comerciales

distintos de Agar MacConkey durante el aislamiento e identificación de la cepa de *Escherichia coli*, sin realizar pre enriquecimiento en Caldo MacConkey.

- d) **Robustez:** se realizaron análisis en diferentes días consecutivos de trabajo y variables ambientales en diferentes áreas de trabajo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Método cuantitativo:**

- a) **Evaluación del diluyente:** finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de las U.F.C y los cálculos estadísticos de media, varianza y desviación estándar del conteo obtenido con cada uno de los medios utilizados, en base al tamaño de la muestra. Con los resultados obtenidos se realizó el cálculo del Test de F para comparar las varianzas y determinar si son o no homogéneas, el valor de F experimental se obtiene con los datos obtenidos de los cálculos realizados y se compara con el valor de F de tablas [9], que es una tabla estadística que relaciona el número de muestras a validar entre el número de muestras estándar, si el resultado de F experimental es menor que F tablas se acepta la hipótesis de que las varianzas son homogéneas. Al ser las varianzas homogéneas, se realizó el cálculo de la desviación estándar combinada y *t-student*. [9]. Los cálculos estadísticos obtenidos del valor de *t* experimental (1,7889) comparándolo con el valor de las tablas  $t=0,0025$ , 18 (2,1009) siendo la *t* experimental menor que el *t* de tablas, expresa que no existe diferencia significativa en cuanto a la recuperación del microorganismo con respecto al diluyente estándar. Por lo tanto el uso del diluyente (Caldo Lethen) no afectó la recuperación de microorganismos.
- b) **Especificidad, exactitud y porcentaje de recuperación:** transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias de cada uno de los jarabes evaluados y los cálculos de los porcentajes de recuperación (%R) obteniendo una media para el Caldo Digerido Caseína de Soja + polisorbato + productos (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo %R:

93,20% (*S. typhi*), 95,55% (*E. coli*), 97,14% (*P. aeruginosa*) y 97,79% (*S. aureus*). Mientras que para el medio Caldo Lethen (neutralizante Lecitina) + productos (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo fueron 94,56 % (*S. typhi*), 96,70% (*E. coli*), 95,75% (*P. aeruginosa*) y 93,65% (*S. aureus*). Se comprobó de este modo que los neutralizantes, al interaccionar con el producto eliminan la acción del conservador del jarabe, por lo tanto no tienen influencia en la recuperación microbiana, ya que en los resultados obtenidos se mantuvieron sobre los límites establecidos (mayor al 70 %) [5].

- c) **Precisión:** se calculó el porcentaje de Coeficiente de Variación (%CV) relacionado con los porcentajes de recuperación y medias de los valores obtenidos en la prueba de especificidad y exactitud, obteniendo los siguientes resultados en Caldo Digerido Caseína de Soja + polisorbato + productos (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo: 1,38% (*S. typhi*), 1,04% (*E. coli*), 1,60% (*P. aeruginosa*) y 1,31% (*S. aureus*), mientras que para el Caldo Lethen + producto (Jarabe a base de *Hedera hélix*) + inóculo fueron 6,27% (*S. typhi*), 2,28% (*E. coli*), 3,64% (*P. aeruginosa*) y 4,44% (*S. aureus*). Estos resultados indican que el método es confiable bajo las condiciones en las que se llevó a cabo, ya que los %CV fueron menores al 15% como lo establece la referencia oficial para productos no estériles [5].
- d) **Límite de detección y cuantificación:** se obtuvo un recuento de microorganismos menor de 100 UFC/mL, siendo más bajo que en las diluciones con la cepa de prueba, el recuento observado en Agar Digerido Caseína y Soya + neutralizantes y en el Agar Lethen) es similar en las placas de medio con producto y medio con microorganismo.
- e) **Tolerancia:** no se observó variación de crecimiento en los dos medios de cultivo evaluados (Agar Digerido Caseína y Soya + neutralizantes y en el Agar Lethen), obteniendo un recuento similar (cuantificación) de los diferentes microorganismos ensayados, esto se confirmó mediante los %R obtenidos que fueron mayores al 70%, límite establecido por la

referencia oficial [5]. Estos resultados sugieren que se desarrolló un método confiable y aceptable.

- f) **Robustez:** el % de recuento microbiano fue equivalente en los dos medios de cultivo utilizados durante el análisis del método de cuantificación (Agar Digerido Caseína y Soya + neutralizantes y Agar Lethen), con un porcentaje de recuperación mayor al 70% en las BAM, indicando que el método es robusto y no es afectado por la utilización del medio de cultivo como el Agar Lethen.

#### **Método cualitativo:**

- a) **Especificidad:** se visualizó el crecimiento característico positivo de *E. coli* en el Agar MacConkey y negativo cuando se inoculó esta bacteria en Agar Manitol Salado, estos resultados se verificaron con cada una de las cepas utilizadas, así mismo se realizaron los controles positivos y negativos obteniendo resultados conformes.
- b) **Límite de Detección:** se apreció crecimiento característico de *E. coli* en el Agar MacConkey y de *S. typhi* en el Agar con Sulfito de Bismuto, siendo el resultado conforme al observar que las colonias de dichas bacterias tenían la forma y color característicos en los medios de cultivo selectivos.
- c) **Tolerancia:** el medio de cultivo caldo MacConkey es el indicado para pre enriquecimiento y posterior aislamiento e identificación de la cepa de *E. coli* (USP 41). Para evaluar la tolerancia se cultivó esta cepa en Caldo Digerido de Soja y se estrió en Agar MacConkey (se utilizaron dos lotes y marcas comerciales diferentes), obteniendo colonias características en el medio, obteniendo resultados conformes y demostrando que el método tolera cambios tales como el no realizar el pre enriquecimiento sino el estriado directo en medio selectivo Agar MacConkey.
- d) **Robustez:** se evaluó mediante la ejecución de los análisis microbiológicos en diferentes días, cambiando las variables ambientales realizando los análisis en diversas áreas, obteniendo resultados similares y confiables, por lo cual el método es conforme.

## CONCLUSIONES

La metodología alternativa propuesta para el control de calidad microbiológica de fitofármacos y fitomedicamentos utilizando Caldo Letheen permitió cuantificar bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras y cualificar microorganismos específicos tales como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* considerados microbiota objetable dentro de los criterios de aceptación para la calidad microbiológica de formas farmacéuticas no estériles. Por otra parte, las pruebas preliminares y la verificación de la metodología, permitió garantizar la confiabilidad de los resultados. De igual modo, los parámetros de validación establecieron que el método es específico, preciso, sensible, tolerante y robusto para la evaluación microbiológica cuali-cuantitativa de fitofármacos y fitomedicamentos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Canil A, Guffanti M, Verón L, Zaccardo R, Bitonte L, Mariani G, Rodríguez Y. Métodos microbiológicos alternativos: revisión del proceso de validación para la implementación en la industria farmacéutica. Instituto Nacional de Medicamentos; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2020. [Página web]. [acceso: 22 de julio de 2022]. Disponible en: ([https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/metodos\\_microbiologicos\\_alternativos\\_cr6.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/metodos_microbiologicos_alternativos_cr6.pdf))
- [2] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Agilent Technologies. España. 2001. p. 135-153
- [3] Ortega M, Rodríguez C, Zhurbenko R. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Rev. Cubana Hig. y Epidemiol. 2013. 51. (1). p. 111-121.
- [4] Do Val, R y Faria Lemos, M. (s.f.) Validación Secundaria de Método Microbiológico: un ejemplo. TECAM Laboratorios. [Página web]. [acceso: 1 de julio de 2022]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/421731689/9-35-Validacion-Secundaria-de-Metodo-Microbiologico>
- [5] The United States Pharmacopeia (USP) 41. Printed by National Publishing, Philadelphia, P.A. 2018. p. 6474, 6380, 7821.
- [6] Morales, M y Morales J. Plantas medicinales, fitofármacos, y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica. En: Plantas Medicinales y Medicina Natural. Chile. Editorial Ocho Libros. 2015. p. 54
- [7] Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2013. [Página web]. [acceso: 13 de julio de 2022]. Disponible en: ([www.who.int](http://www.who.int))
- [8] Camaró M, Catalá V, Cardona C, Martínez R, Olmos P. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos en procedimientos en microbiología clínica. Editores: Cercenado E, Cantón R. Editorial EIMC. 2013. p. 1-35.
- [9] Statologos. [Página web]. [acceso: 18 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://statologos.com/como-leer-la-tabla-de-distribucion-f/>.

**Clody Yudith Rojas Gelves:** Farmacéutico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA, 2002). Magister Scientiae en Química de Medicamentos (ULA, 2015). Profesora Ordinaria categoría Agregado adscrita al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA (2009-2022). ORCID: 0000-0002-3896-9955

**Alida Alejandra Pérez Colmenares.** Farmacéutico egresada de la Universidad de Los Andes (ULA, 2003). Magister Scientiae en Química de Medicamentos (ULA, 2011). Doctor en Química Aplicada, Mención Química Orgánica (ULA, 2012). Profesora del Postgrado en Química de Medicamentos adscrita al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA (2012-2022). ORCID: 0000-0001-8910-4663

Artículo original

# Disbiosis cervico-vaginal en la pesquisa citológica de cáncer de cuello uterino.

Cervico-vaginal dysbiosis in cytological screening for cervical cancer.

Erazo-Nieto Greca<sup>1</sup>, Toro de Méndez Morelva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento Bioanálisis Clínico. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, C.P. 5101, Venezuela.

Recibido: julio de 2022–Aceptado: septiembre de 2022

## RESUMEN

La citología de cuello uterino es utilizada para la pesquisa de cáncer y sus lesiones pre-malignas, permite también realizar valoración microbiológica rápida y presuntiva para detectar organismos patógenos causantes de infecciones o disbiosis cervico-vaginales. El objetivo fue conocer el estado de disbiosis mediante prevalencia y etiología citológica de infecciones genitales en pacientes merideñas, durante la pesquisa de cáncer de cuello uterino. Se seleccionaron 1.262 resultados citológicos de casos analizados entre septiembre 2019 y diciembre 2020, y se correlacionaron las variables implicadas. La prevalencia general de disbiosis cervico-vaginal fue de 79,80%, más frecuente entre los 20-50 años de edad (67,2%) y principalmente causada por bacterias cocoides (22,18%). El 82,85% de las citologías anormales presentó disbiosis y se correlacionó significativamente con *Trichomonas vaginalis* ( $p<0,000$ ), organismos fúngicos consistentes con *Candida* spp ( $p<0,003$ ), cambios celulares sugestivos de infección por *Chlamydia* ( $p<0,012$ ) e inflamación inespecífica ( $p<0,000$ ). La disbiosis como factor de riesgo para citología anormal obtuvo un valor de riesgo relativo (RR) igual a 1,167, IC del 95%; 1,073-1,269, en comparación con los casos sin infección y lactobacilos/citólisis. La disbiosis cervico-vaginal podría ser un cofactor importante en el inicio de la carcinogénesis cervical asociada a infección por virus papiloma humano

(HPV) oncogénico en las mujeres merideñas. Esta suposición debe aclararse mediante futuras investigaciones multidisciplinarias.

## PALABRAS CLAVE

Disbiosis, infecciones cervico-vaginales, citología anormal, HPV, cáncer de cuello uterino.

## ABSTRACT

Cervical cytology is used to screen for cancer and pre-malignant lesions, it also allows rapid and presumptive microbiological assessment to detect pathogenic organisms that cause infections or cervical-vaginal dysbiosis. The objective was to know the state of dysbiosis through the prevalence and cytological etiology of genital infections in patients infected by sexual transmission from Merida, during the investigation of cervical cancer. 1.262 cytological results of sexual transmission were selected, from September 2019 to December 2020, and the variables involved were correlated. The general prevalence of cervical-vaginal dysbiosis was 79.80%, more frequent between 20-50 years of age (67.2%), and mainly caused by coccoid bacteria (22.18%). 82.85% of the abnormal cytologies presented dysbiosis and were significantly correlated with *Trichomonas vaginalis* ( $p<0.000$ ), fungal organisms consistent with *Candida* spp ( $p<0.003$ ),

cellular changes suggestive of *Chlamydia* infection ( $p < 0.012$ ) and inflammation nonspecific ( $p < 0.000$ ). Dysbiosis as a risk factor for abnormal cytology obtained a relative risk value (RR) equal to 1.167, 95% CI: 1.073-1.269, compared to cases without infection and with lactobacilli/cytolysis. Cervical-vaginal dysbiosis could be an important cofactor in the onset of cervical carcinogenesis associated with oncogenic *HPV* infection in Merida women. This assumption needs to be clarified by future multidisciplinary research.

## KEY WORDS

Dysbiosis, cervico-vaginal infections, abnormal cytology, *HPV*, cervical cancer.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cuello uterino es una causa importante de mortalidad en mujeres de 35 a 45 años de edad. En el año 2020 se estimó que 604.000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de cuello uterino en todo el mundo y alrededor de 342.000 murieron a causa de la enfermedad. El cáncer de cuello uterino es el más comúnmente diagnosticado en países que se encuentran en África Subsahariana, América del Sur y Sureste Asiático. Numerosos estudios han confirmado la relación causal entre esta neoplasia y la infección persistente por ciertos tipos de Virus Papiloma Humano (*HPV*, siglas en inglés) de alto riesgo oncogénico, aunque por sí solo es un factor insuficiente para inducir la carcinogénesis del cuello uterino [1-3].

En eubiosis, la vagina humana es un ecosistema balanceado y dinámico, caracterizado por una baja diversidad microbiológica, ya que está constituido por una población bacteriana dominada, en hasta un 95%, por especies del género *Lactobacillus* (L), conformando la microbiota vaginal bacteriana habitual característica de la etapa reproductiva. Estas bacterias ejercen un efecto protector y están relacionadas de forma directa con la salud vaginal, ya que despliegan diversos mecanismos complementarios entre sí, que incrementan la función protectora del epitelio escamoso y, muy especialmente, mantienen las vías moduladoras de

la respuesta inmune innata, a fin de evitar la proliferación de microorganismos patógenos [4-6]. Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, aerobias facultativas, algunas crecen mejor en condiciones anaerobias o microaerófilas, que degradan enzimáticamente el glucógeno no soluble almacenado en el citoplasma de las células maduras intermedias del epitelio vaginal hasta ácido láctico, el cual mantiene un pH entre 3,5 y 4,5. También son formadores de biopelículas protectoras sobre la mucosa epitelial y además producen otros compuestos como bacteriocidas y virucidas, que mantienen el equilibrio del microambiente vaginal e impiden que organismos patógenos oportunistas o de transmisión sexual sean adquiridos, proliferen y persistan, causando infección e inflamación crónica que conducen a un estado de disbiosis cervico-vaginal, así como a complicaciones obstétricas y ginecológicas. En ello influyen diversos factores endógenos y exógenos como la edad, genética, origen étnico, factores hormonales, enfermedades crónicas, uso de anticonceptivos orales o del dispositivo intrauterino (DIU), conducta sexual, higiene íntima, entre otros [5,7]. La microbiota vaginal es propia de cada mujer y ha sido definida mediante Comunidades Bacterianas (CST, siglas en inglés) de tipos diferentes I-V, dependiendo de la especie de lactobacilos predominante, en las de tipo I, II, III y V predomina *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners*, y *Lactobacillus jensenii*, respectivamente. La CST IV es heterogénea en composición, pues ocurre una sustitución de los lactobacilos por especies bacterianas anaeróbicas y facultativas, instalándose el estado de disbiosis con aumento significativo del pH vaginal y diversidad microbiológica, aumentando así el riesgo para el desarrollo de infecciones de transmisión sexual incluyendo la infección persistente por *HPV* oncogénico [7-10]. Por tanto, la comunidad bacteriana Tipo IV o condición de disbiosis ha surgido como un factor potencial de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino, ocurriendo básicamente cuando la concentración balanceada de lactobacilos disminuye o éstos son sustituidos por la proliferación de cualquier organismo patógeno bacteriano, micótico, parasitario y/o

viral, con el consecuente desequilibrio en la composición de la microbiota vaginal, conocido tradicionalmente como infecciones cervico-vaginales [11-14]. En consecuencia, el microambiente inflamatorio sostenido que se genera, aunado a la pérdida de la integridad epitelial y la citotoxicidad favorece específicamente la adquisición de la infección por *HPV* oncogénico y el desarrollo posterior de lesiones pre-malignas de alto grado y cáncer invasor de cuello uterino [12,15,16].

La citología de cuello uterino es la herramienta utilizada a nivel mundial para la pesquisa de cáncer y sus lesiones pre-malignas, conocidas citológicamente con el término de Lesión Intraepitelial Escamosa (SIL, siglas en inglés) de bajo y alto grado, o histopatológicamente como Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN, siglas en inglés). El frotis citológico cervico-vaginal teñido con la técnica de Papanicolaou también permite realizar una valoración microbiológica rápida y presuntiva, a fin de detectar organismos patógenos infecciosos. El sistema Bethesda 2014 es la clasificación vigente utilizada para el informe de los hallazgos citológicos, oncológicos y microbiológicos, del cuello uterino [11]. La consulta ginecológica tiene como principal objetivo la detección precoz del cáncer de cuello uterino, entre otras neoplasias ginecológicas, lo cual se realiza mediante citología y colposcopia. Además, durante esta consulta es posible realizar cualquier otro tipo de diagnóstico de enfermedad genital benigna, como ocurre frecuentemente con las infecciones cervico-vaginales o disbiosis cervico-vaginal.

En los últimos años, se ha retomado el estudio de la posible relación entre la disbiosis cervico-vaginal, la infección persistente por *HPV* oncogénico y el desarrollo posterior de lesiones de alto grado CIN3/carcinoma *In Situ*, encontrándose una asociación positiva entre ellos, con evidencias cada vez más sólidas [15-24], ya que se ha observado, por ejemplo, una diferencia significativa en el perfil microbiológico vaginal (CST IV) de las pacientes con *HPV* oncogénico y CIN3 y el perfil posterior a la remoción de la lesión en las mismas pacientes, cambiando a comunidades bacterianas I, II, III o V, con predominio de lactobacilos [25]. La composición de la microbiota

vaginal incide en la prevalencia de la infección por *HPV* oncogénico así como su posible evolución a CIN3. El perfil de la CST IV, frecuentemente dominado por bacterias asociadas a vaginosis bacteriana, ha surgido entonces como un posible factor de riesgo en el proceso multifactorial de la carcinogénesis del cuello uterino [26]. El objetivo de este estudio fue conocer el estado de disbiosis mediante la prevalencia y etiología citológica de infecciones cervico-vaginales en pacientes merideñas, que acudieron a la consulta de pesquisa de cáncer de cuello uterino, especialmente en aquellas con citologías anormales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron todos los resultados citológicos de cuello uterino de las pacientes que acudieron a la consulta de pesquisa de cáncer de cuello uterino, en entidades públicas y privadas del estado Mérida, Venezuela, durante el período septiembre 2019 y diciembre 2020. Para este estudio, no se establecieron criterios de inclusión o exclusión y tampoco fue necesario el consentimiento informado pues se trata de un estudio retrospectivo. Las muestras citológicas fueron tomadas mediante la técnica convencional usando espátula de Ayre y cytobrush, fijadas inmediatamente con cytofix e informadas según las pautas del sistema Bethesda para el informe de los hallazgos citológicos del cuello uterino [11]. Al culminar la recopilación de la información clínico-citológica a partir de la solicitud de citología (los hallazgos histopatológicos y microbiológicos no estaban disponibles), los datos fueron incluidos en el programa Excel versión 2007 y codificados para efectos estadísticos. Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las variables categóricas utilizando el software SPSS versión 15, determinándose la distribución de frecuencias y porcentajes simples. Así mismo, se determinó las medias de tendencia central (media aritmética y mediana) y variabilidad (desviación típica y error típico de la media) a las variables cuantitativas continuas. Se aplicó la *T de Student* (95% de significancia) y Chi cuadrado para observar la asociación entre variables cualitativas; un valor

$p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Para determinar factores de riesgo se aplicó el valor Odds Ratio (OR), riesgo relativo con 95% de significancia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio, se seleccionaron 1.262 resultados citológicos de cuello uterino. La información clínica fue tomada de cada solicitud de examen citológico. La edad promedio fue de 38

años  $\pm$  13,5 años, con un rango de edad de 9 a 89 años. De los 1.262 casos, 30 no indicaron la edad en dicha solicitud. Al agruparse los casos por edad, el mayor porcentaje de éstos correspondió al grupo de 31-40 años (28,5%), seguido del grupo de 20-30 años (26,5%) y por último, el grupo de 41-50 años (21,4%). Por tanto, el mayor número de casos analizados (76,4%) se encontró distribuido entre los 20-50 años de edad, como puede visualizarse en la Figura N° 1.

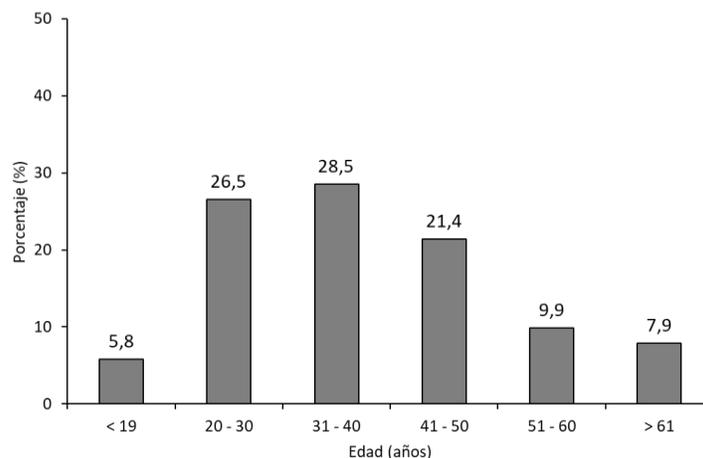


Fig. 1 Distribución de los casos de este estudio por grupos de edad.

Otros datos clínicos obtenidos, a parte de la edad, fueron 108/1.262 (8,72%) casos con DIU, 12/1.262 (0,95%) con anticonceptivos orales y 12/1.262 (0,95%) embarazadas. El 89,38% de las solicitudes de examen no contenía información clínica suficiente y/o relevante para una mejor interpretación de los hallazgos citológicos. En la

impresión clínica (Tabla 1), que incluye signos y síntomas así como la evaluación colposcópica, el 763/1.262 (60,50%) de los casos carecía de esta información. Mientras que en 499/1.262 (39,50%) suministraron algún dato clínico, siendo la leucorrea (16,0%) y cuello uterino sano (14,10%) los más frecuentes

TABLA 1.  
Impresión clínica suministrada en los casos citológicos incluidos en este estudio.

Impresión Clínica	Frecuencia	Porcentaje (%)
Cuello uterino sano	178	14,10
Leucorrea	202	16,00
Vaginitis/Cervicitis	36	2,90
Epitelio blanco/Leucoplasia	3	0,20
Endopia	4	0,30
Ectopia/Ectropión	106	8,40
Zona iodo negativa de contornos netos (ZINCN), contornos difusos (ZINCD)	7	0,60
Otra (atrofia, pólipo, lesión exofítica)	70	5,50
Sin impresión clínica	763	60,50
<b>Total</b>	1.262	100,00

Las muestras citológicas de cuello uterino fueron clasificadas según la categorización general establecida por el sistema Bethesda 2014: 1.227/1.262 (97,2%) negativa para lesión intraepitelial o malignidad y 35/1.262 (2,8%) casos con anomalías en células epiteliales escamosas y/o en las glandulares. No hubo ningún caso clasificado en la categoría general Otra. Dentro de la categorización negativa para lesión intraepitelial o malignidad y en relación a la evaluación citológica microbiológica, se encontró que la frecuencia de la microbiota vaginal bacteriana habitual, representada por los lactobacilos o por su acción enzimática sobre las células epiteliales intermedias con la consecuente lisis citoplasmática o citólisis, fue del 19,00% (279/1.262), mientras que estados de disbiosis estaban presentes en el 79,80% (1.026/1.262) de los casos estudiados; en 21/1.262 casos (1,20%) no se observó ningún tipo

de microorganismo. En el 15,54% (196/1.263) no se evidenció reacción inflamatoria (escasa cantidad de leucocitos polimorfonucleares) con presencia de lactobacilos/citólisis, mientras que en el 39,85% (503/1.262) se observó una reacción inflamatoria de moderada a marcada intensidad en ausencia de lactobacilos / citólisis, estadísticamente significativa ( $p < 0,000$ ). En cuanto a la etiología de las disbiosis, en 347/1.262 (23,30%) de los casos se observó algún organismo patógeno contemplado en el sistema Bethesda 2014 (Tabla 2), con mayor prevalencia de cambios en la flora vaginal sugestivo de vaginosis bacteriana (15,07%). Por otro lado, 699/1.262 (56,50%) casos presentaron organismos patógenos no contemplados en el sistema Bethesda 2014, siendo las bacterias cocoides los más frecuentes (22,18%), seguida de la infección mixta (18,98%).

**TABLA 2.**  
Frecuencia citológica de organismos patógenos detectados en este estudio

<b>Organismos patógenos contemplados por el Sistema Bethesda 2014</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<i>Trichomonas vaginalis</i> .	85	6,04
Organismos fúngicos consistentes con <i>Candida</i> spp.	25	1,78
Cambios en la flora vaginal sugestivos de vaginosis bacteriana.	212	15,07
Bacterias morfológicamente consistentes con <i>Actinomyces</i> spp.	5	0,36
Cambios celulares consistentes con infección por herpes simple tipo 2.	0	0,00
Cambios celulares consistentes con infección por citomegalovirus.	0	0,00
<b>Total</b>	327	23,30
<b>Organismos patógenos no contemplados por el Sistema Bethesda 2014</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Cambios celulares sugestivos de infección por <i>Chlamydia</i> .	12	0,85
Bacterias mixtas (cocoides y bacilares)	120	8,53
Bacterias cocoides.	268	<b>22,18</b>
Otros (organismos levaduriformes, no blastoconidias).	88	6,25
Infección Mixta (2 ó más organismos patógenos).	190	<b>18,98</b>
<b>Total</b>	699	56,50

La relación entre la presencia de infecciones cervico-vaginales y los grupos etarios mostró que este tipo de infecciones fueron más frecuentes en los grupos de edad de 20 y 50 años (67,2%), existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,000$ ) con respecto a los grupos de edad  $\leq 19$  años (5,0%) y  $> 60$  años (2,8%).

En 35 casos (2,8%) se informó una citología anormal, consistente con anomalías en la morfología celular tanto de origen escamoso como

glandular, los cuales se detallan en la Tabla 3, distribuidos así: 15/35 (42,9%) con atipias escamosas (ASC-US y ASCH), seguido de 9/35 (25,8%) con lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL), incluyendo la infección por papilomavirus (LSIL/HPV) y las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) en 2/35 (5,7%) casos. 5/35 casos (14,3%) correspondieron a atipias en células glandulares

endocervicales o endometriales (AGC-NOS). Se detectaron 4/35 (11,4%) casos de cáncer: 2 carcinomas epidermoides, 1 adenocarcinoma *In Situ* endocervical (AIS) y 2 adenocarcinomas endocervicales. En 6/35 casos (17,14%) no había

infección, observándose citólisis/lactobacilos: 3 LSIL/HPV, 1 AGC-NOS, 1 ASC-H y 1 ASC-US. Los estados de disbiosis cervico-vaginal estaban presentes en el 82,85% de las citologías anormales:

**TABLA 3.**  
Citologías anormales (n=35) y organismos patógenos (disbiosis) asociados

Anormalidades en células epiteliales escamosas/glandulares del cuello uterino		Organismos asociados	Intensidad de la respuesta inflamatoria
1	ASC-H	Tv/ BC/ <i>Chlamydia</i>	Marcada
2	ASC-H	Lactobacilos	Sin inflamación
3	ASC-H	Vaginosis bacteriana	-
4	LSIL	Vaginosis bacteriana	-
5	AGC-NOS	<i>Candida</i> spp	Moderada
6	HSIL	Vaginosis bacteriana	-
7	AGC-NOS (endocervicales atípicas)	Inespecífica	Moderada
8	AGC-NOS (endometriales atípicas)	Tv	Marcada
9	ASC-US	<i>Candida</i> spp	Moderada
10	LSIL / HPV	Vaginosis bacteriana	-
11	ASC-US	<i>Candida</i> spp	Moderada
12	ASC-H	BM	Moderada
13	LSIL (escamosas intermedias discarióticas)	BC	Marcada
14	AGC-NOS (endometriales atípicas)	Lactobacilos	Sin inflamación
15	AGC-NOS (endocervicales atípicas)	Tv / BM	Marcada
16	ASC-H	Inespecífica	Marcada
17	LSIL / HPV	Citólisis	Sin inflamación.
18	ADCa	Inespecífica	Moderada
19	LSIL / HPV	Tv / BC	Marcada
20	ASC-H (escamosas profundas atípicas)	<i>Candida</i> spp	Moderada
21	ASC-H	Inespecífica	Moderada
22	LSIL / HPV	Citólisis	Sin inflamación.
23	ASC-H	Tv / BC	Moderada
24	HSIL	BC	Moderada
25	ASC-H	BC	Moderada
26	ASC-H	<i>Candida</i> spp / <i>Chlamydia</i> /Lactobacilos	Moderada
27	ADCa endocervical	-	Sin inflamación.
28	LSIL / HPV	BC	Marcada
29	Ca epidermoide	Tv / BC	Moderada
30	LSIL / HPV	Citólisis	Sin inflamación.
31	ASC-US	BM	Moderada
32	LSIL / HPV	<i>Candida</i> spp	Moderada
33	ASC-US	Citólisis	Sin inflamación.
34	ASC-US	Tv / <i>Candida</i> spp / BC	Marcada
35	AIS endocervical	Tv / BC	Marcada

Tv: *Trichomonas vaginalis*. BC: bacterias cocoides. BM: bacterias mixtas (cocoides y bacilares). Inespecífica: no se observó agente causal ni signos sugestivos. ASC-US: células escamosas atípicas de significado indeterminado. ASC-H: células escamosas atípicas, no se puede descartar una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). LSIL: lesión intraepitelial escamosa de bajo grado. HSIL: lesión escamosa intraepitelial de alto grado. AGC-NOS: células glandulares atípicas de significado indeterminado. HPV: virus del papiloma humano. ADC: adenocarcinoma. AIS: adenocarcinoma in situ. Ca: carcinoma invasor.

infección mixta (por 2 ó más patógenos) en 7/35 casos (20,0%), seguido de 6/35 (17,1%) casos con infección por bacterias cocoides o mixtas: cocoides y bacilares y en 6/35 (17,1%) se observaron organismos fúngicos/*Candida* spp. La prevalencia de cambios en la flora vaginal sugestivos de vaginosis bacteriana fue de 4/35 (11,4%) y de infección por *Trichomonas vaginalis* 22,9% (8/35

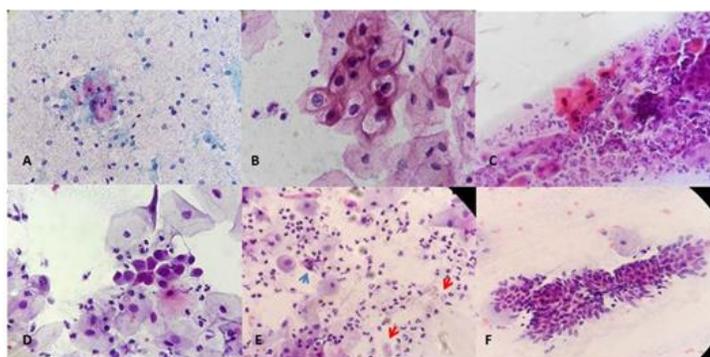
casos), ya sea como único patógeno (1 caso) ó en infección mixta (7 casos). En los 7/35 casos de infección por LSIL/HPV (20,0%) se detectó cambios en la flora vaginal sugestivos de VB (1 caso), infección mixta (1 caso), bacterias cocoides (1 caso), *Candida* spp (1 caso) y citólisis

(3 casos). Se observó respuesta inflamatoria de moderada a marcada intensidad en el 82,85% (29/35) de los casos. En la Figura 2 se pueden apreciar algunas imágenes ilustrativas de las citologías anormales.

La correlación entre los hallazgos citológicos anormales y la presencia de organismos patógenos y no patógenos (lactobacilos/citólisis) arrojó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,00$ ) en los casos citológicos anormales con infección genital: *Trichomonas vaginalis* 8/35

( $p < 0,000$ ), organismos fúngicos consistentes con *Candida* spp 4/35 ( $p < 0,003$ ), cambios celulares sugestivos de infección por *Chlamydia* 2/35 ( $p < 0,012$ ) e inflamación inespecífica 4/35 ( $p < 0,000$ ).

Entre los factores de riesgo más asociados al desarrollo de infecciones cervico-vaginales (Tabla 4), con un valor de riesgo relativo (RR), se encontró el uso de DIU (1,128) y la presencia de leucorrea (1,109).



**Fig. 2** Ilustración de los casos de citología de este estudio. **A.** Fase lútea avanzada, células intermedias morfológicamente normales, citólisis (núcleos sueltos de células escamosas intermedias) y lactobacilos, 20X. **B.** 17 años. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, infección por HPV (coilocitos), bacterias cocoides, 40X. **C.** 22 años. Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, células superficiales discarióticas, tricomoniasis y bacterias cocoides, 10X. **D.** 37 años. Lesión intraepitelial escamosa de alto grado, células basales malignas de tipo metaplásico, bacterias cocoides, 40X. **E.** 29 años. Carcinoma epidermoide, células fibroides malignas (flecha azul), bacterias cocoides y *Trichomonas vaginalis* (flecha roja), 20X. **F.** 40 años. Adenocarcinoma endocervical *In Situ*, bacterias cocoides, 10X. Coloración de Papanicolaou.

**TABLA 4.**

Factores de riesgo más asociados al desarrollo de disbiosis cervico-vaginal

Infecciones cervico-vaginales (disbiosis)									
Factor de Riesgo	Presencia		Ausencia		Total		RR	Intervalo de confianza	
	Número	%	Número	%	Número	%		Inferior	Superior
Dispositivo intrauterino (DIU)	98	90,7	10	9,3	108	100,0	<b>1,128</b>	1,056	1,206
Leucorrea	179	88,6	23	11,4	202	100,0	<b>1,109</b>	1,047	1,175
Anticonceptivo oral	11	91,7	1	8,3	12	100,0	1,028	0,949	1,341
Vaginitis/Cervicitis	30	83,3	6	16,7	36	100,0	1,026	0,884	1,190
Endopia	3	75,0	1	25,0	4	100,0	0,922	0,523	1,625
Ectopia/Ectropión	91	85,8	15	14,2	106	100,0	1,061	0,978	1,152

El análisis de las infecciones cervico-vaginales o disbiosis como factor de riesgo para el desarrollo de anomalías en células epiteliales escamosas y/o glandulares reveló que en 29/35 (94,40%) de los casos con citología anormal estaba asociado un proceso infeccioso, con un riesgo relativo (RR: 1,167 IC del 95%; 1,073-1,269), en comparación

con los casos sin infección y presencia de microbiota bacteriana habitual.

Un resultado citológico de cuello uterino con presencia de lactobacilos o de citólisis indica la existencia de un efecto protector del ecosistema vaginal y estado saludable genital. Por tanto, la desaparición de dicha protección biológica favorecería la adquisición, proliferación y

persistencia de organismos infecciosos, provocando el establecimiento de un estado de disbiosis, caracterizado por una microbiota diversa. La alta prevalencia de las infecciones cervico-vaginales es considerada un problema de salud ginecológica y reproductiva femenina, por lo que es intensamente estudiada en la actualidad, debido a que dichos estados de disbiosis podrían tener una implicación importante en la fase de iniciación de la carcinogénesis en el cuello uterino asociado a *HPV* oncogénico, así como en diversas emergencias obstétricas [15,17,18,19,22,23,27].

La población joven y sexualmente activa es más propensa a padecer de infecciones genitales o disbiosis [17,28]. En este estudio, la edad promedio fue de 38 años  $\pm$  13,5 años, coincidiendo con otras investigaciones locales e internacionales [17,27,29], lo que demuestra que la disbiosis cervico-vaginal es muy frecuente en edad reproductiva, la cual oscila entre los 18 y 50 años [17,30]. Además, en esta investigación, la mayor prevalencia (67,2%) de las cervico-vaginitis se encontró entre los 20 y 50 años de los casos estudiados, siendo estadísticamente significativo, en relación a los otros grupos etarios ( $\leq$  19 y  $>$  60 años), lo cual podría deberse a diversos factores que influyen directamente en la variación de la microbiota vaginal y que son considerados de riesgo para el desarrollo de disbiosis, como la raza o grupo étnico, edad y fisiología hormonal (ciclo menstrual y embarazo), la actividad sexual (promiscuidad, no uso del condón, semen, espermicidas) y factores conductuales (uso frecuente de duchas vaginales, DIU), variedad de productos de higiene íntima, tabaquismo, alimentación y deficiencias nutricionales), entre otros. En consecuencia, todos estos factores podrían desencadenar un estado de disbiosis, mayor exposición y adquisición de infecciones de transmisión sexual y de proliferación y persistencia de organismos patógenos como *Chlamydia*, HIV, virus del herpes y *HPV*, además de un mayor riesgo para otras enfermedades de importancia clínica como el cáncer cervical [9,10,15,22,23,31].

La insuficiente información clínica pertinente proporcionada en la solicitud del examen, tiene impacto en la interpretación de las pruebas de laboratorio y también responsabilidad en errores subyacentes [32]. El sistema Bethesda 2014 para el

informe de la citología cervico-vaginal exige, entre los parámetros de adecuación de la muestra, disponer de información clínica relevante que puede contribuir favorablemente en una mejor interpretación de los hallazgos citológicos [11]. En este estudio, un elevado porcentaje de solicitudes no contenía suficiente información clínica relacionada, en comparación con el 40,9% del estudio de Costa y cols 2018 [33]. Un menor porcentaje de solicitudes de examen informaron el uso del DIU, anticonceptivos orales o embarazo actual. Resultados similares fueron hallados por Guillen y cols 2003 [29], donde el 17,37% informaron que eran usuarias de algún método anticonceptivo y el resto (82,63%) no refirió información clínica pertinente, lo cual revela que es una deficiencia común en esta localidad. La leucorrea fue el hallazgo clínico/colposcópico más informado (16,00%) en este estudio. En otros estudios, este hallazgo alcanzó mayor porcentaje 70,05% [34] y 87,29% [35]. Esta marcada diferencia quizás se debe a que fue reservada la información o simplemente que las pacientes eran asintomáticas. La orientación clínica señalando las características macroscópicas de una secreción vaginal patológica, no fisiológica, basada por ejemplo en los criterios de Amsel o en el índice BACOVA [17], podría ser de gran ayuda para la identificación precisa del agente causal, aumentando así la correlación clínica-citológica-microbiológica y efecto terapéutico eficaz [36-38].

La disminución en la concentración o la sustitución de los lactobacilos se traduce en disbiosis. En el presente estudio, se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los casos con o sin lactobacilos/citólisis y la presencia de respuesta inflamatoria, donde el 39,85% mostró exudado inflamatorio de moderada a marcada intensidad, en ausencia de microbiota bacteriana habitual, frente al 15,54% con lactobacilos/citólisis y escasos leucocitos PMN. Baka y cols 2013 [39] tuvieron hallazgos aún más elevados, donde en el 55,7% de los casos citológicos se observó un proceso inflamatorio y además en el 59,6% de los casos hubo cultivos positivos, con diferentes microorganismos patógenos, mientras que el grupo de mujeres sin inflamación en la prueba de

Papanicolaou mostró un porcentaje significativamente mayor de cultivos negativos (67,1%,  $p < 0,001$ ). Este hallazgo demuestra que la desaparición de la acción protectora de la microbiota vaginal habitual, con desequilibrio en el ecosistema cervico-vaginal y elevación del pH vaginal, favorece el establecimiento de un medio pro-inflamatorio sostenido, permitiendo así el efecto de metabolitos carcinogénicos sobre la mucosa epitelial y la mayor posibilidad de transformación celular neoplásica [5,9,12,13,25,40-42]. Por otra parte, el predominio de ciertas especies de lactobacilos es determinante para el establecimiento de CST IV. Las comunidades bacterianas en mujeres premenopáusicas sanas suelen estar pobladas por especies de lactobacilos que aseguran un pH vaginal ácido, además los lactobacilos secretan una variedad de productos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano y su adhesión epitelial, con formación de biopelículas por competencia. La presencia de *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii* generan un efecto protector contra la disbiosis, mientras que la especie *L. iners* se asocia con bacterias de la CST IV, principalmente las causantes de vaginosis bacteriana y también con lesiones pre-malignas del cuello uterino [13,15,17,18,43]. Por lo antes expuesto, es necesario realizar investigaciones multidisciplinarias a fin de caracterizar la microbiota bacteriana habitual de esta localidad, de manera que puedan compararse con estudios relacionados y así establecer cuáles son las comunidades bacterianas prevalentes y su posible relación con el posterior desarrollo de neoplasia del cuello uterino asociada a la infección por HPV oncogénico.

La comparación y discusión de hallazgos citológicos referentes a disbiosis cervico-vaginal es dificultosa, pues influyen las características epidemiológicas de la población en estudio, la terminología variable utilizada para designar las infecciones genitales y las manifestaciones clínicas de las mismas, así como la metodología y parámetros de laboratorio utilizados para establecer la identificación y prevalencia de los diferentes patógenos asociados. Este estudio fue realizado a partir de muestras citológicas, con la intención de conocer también los aspectos actuales relacionados

con las cervico-vaginitis infecciosas, a fin de vincular la terminología citológica con la microbiológica actual y así mejorar la correlación entre los dos métodos, para que a futuro, sea posible estandarizar los términos relacionados con las infecciones genitales, aumentar su utilidad clínica y facilitar el desarrollo de futuras investigaciones multidisciplinarias. La prevalencia de las infecciones o disbiosis cervico-vaginal es variable a nivel mundial, siendo elevada en muchas localidades de países en desarrollo como Venezuela, lo cual exige la certera identificación de los agentes etiológicos (bacterias anaeróbicas vs aeróbicas, parásitos y virus) o su confirmación mediante métodos específicos, para una intervención clínica eficaz [38,44] y de esta forma interrumpir la persistencia inoportuna de un ambiente de desequilibrio microbiológico permisivo para la persistencia de infecciones de transmisión sexual, principalmente el HPV oncogénico. En este estudio, el 79,80% de los casos citológicos informó la presencia de infección genital, siendo semejante a los hallazgos de Jahic y cols 2013 [34] (96,0%), Nadembega y cols 2017 [35] (74,0%) y Ameyapoh y cols 2021 [45] (77,42%). Mientras que difiere de los resultados de Villaseca y cols 2015 [27] y Majigo y cols 2021 [46], en los que la prevalencia de infecciones vaginales es más baja 46,5% y 65,3% respectivamente, pudiendo deberse a las diferentes poblaciones estudiadas con otro tipo de características socio-demográficas y culturales o también a los métodos de diagnóstico utilizados. La alta frecuencia de disbiosis en mujeres en edad reproductiva requiere de un diagnóstico microbiológico oportuno y claro, apoyándose en métodos como la bacteriología, parasitología e incluso la biología molecular, que permiten identificar certeramente a los diferentes organismos patógenos, incluyendo el HIV y los genotipos específicos HPV-16 y HPV-18, entre otros más. De esta forma se aplicaría el tratamiento adecuado para erradicarlas definitivamente, evitando la persistencia o la recurrencia de disbiosis, un posible cofactor en la carcinogénesis del cuello uterino.

Las infecciones bacterianas (incluyendo la vaginosis bacteriana), la tricomoniasis y las infecciones mixtas fueron las más frecuentes en

este estudio, coincidiendo con otros en que la vaginosis bacteriana es la disbiosis más frecuente y por ello quizás la más estudiada [17,27,28]. Estos estados de disbiosis, especialmente cuando ocurren en pacientes jóvenes, están asociados a serios problemas de fertilidad, obstétricos y ginecológicos como infertilidad, rotura prematura de las membranas placentarias, parto prematuro, recién nacidos con bajo peso, muerte neonatal, variedad de infecciones de transmisión sexual y cáncer de cuello uterino [28,44]. Además de estas infecciones, la vaginitis aeróbica es una entidad clínica reconocida recientemente, aunque probablemente es lo que se ha informado tradicionalmente en la citología como vaginitis bacteriana y que puede confundirse clínicamente con la vaginosis bacteriana, que se define como una alteración de la microbiota vaginal, caracterizada por disminución de lactobacilos y una mayor cantidad de bacterias aeróbicas entéricas (*E. coli*, *S. aureus*, *Streptococos* del grupo B y del género *Enterococcus*), con niveles variables de inflamación y un papel desconocido en el origen de la enfermedad neoplásica cervical [7,9,10]. Aunque no existen suficientes datos, se estima que la frecuencia general de la vaginitis aeróbica podría ser de hasta 50% en pacientes con CIN1 [9]. Las infecciones mixtas causadas por 2 ó más microorganismos patógenos también tuvieron una frecuencia importante en esta investigación (18,98%). Ozal Mora 2019 [38] afirma que cada vez es más frecuente encontrar mujeres con vaginitis mixta y que además es un cuadro que dificulta el tratamiento adecuado, pues la presentación clínica es confusa, poco precisa, por lo que se requiere la identificación clara de los organismos implicados para su correcto tratamiento. Además, destaca que la misma consiste en la coexistencia de micosis y tricomoniasis, de micosis y vaginosis bacteriana o de micosis y vaginitis aeróbica. La incidencia de vulvovaginitis micótica en asociación con vaginosis bacteriana es aproximadamente del 34,0%, y agrega que hay una importante asociación entre vaginosis bacteriana y *Candida albicans*, que hace que las infecciones vaginales mixtas tengan importancia clínica y epidemiológica. Por tanto, la vaginosis bacteriana, tricomoniasis, vaginitis aeróbica y las infecciones mixtas son disbiosis

frecuentes en esta localidad, que deben ser estudiados y considerados con mayor detenimiento, sujetas a seguimiento y confirmación microbiológica, ya que podrían estar asociadas con el desarrollo de lesiones pre-malignas del cuello uterino.

La disbiosis cervico-vaginal podría ser un cofactor que actúa en la fase de inicio de la carcinogénesis del cuello uterino, asociada a infección por *HPV* oncogénico [13,21,24,47], ya que al parecer existe una relación compleja entre la disminución de la acción protectora de los lactobacilos, el efecto nocivo de productos y metabolitos microbiológicos en estado de disbiosis y el desarrollo del cáncer de cuello uterino. Existen evidencias actuales de diversos mecanismos implicados en este proceso multifactorial, aunque insuficientes para la comprobación de la relación causal [24]. El cáncer de cuello uterino es un grave problema de salud pública por su alta incidencia y mortalidad en países en vías de desarrollo y es, por tanto, una prioridad en la salud mundial. En esta investigación, el 2,8% de los casos correspondieron a citologías anormales y mostraron organismos patógenos asociados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los casos con presencia de *Trichomonas vaginalis*, *Candida* spp y *Chlamydia trachomatis*. La persistencia de ciertos procesos infecciosos en un medio inflamatorio mantiene alterada la composición de la microbiota vaginal habitual. Este tipo de comunidad bacteriana tipo IV se asocia a la adquisición y persistencia de la infección por *HPV* oncogénico, factor que induce la transformación celular maligna, a través del despliegue de múltiples mecanismos moleculares, donde la evasión de la respuesta inmune tiene un papel preponderante [13,18,44]. Los resultados de este estudio revelan que la infección por *Trichomonas vaginalis* podría estar asociada significativamente al desarrollo de anomalías en células epiteliales, infección persistente por *HPV* oncogénico y cáncer de cuello uterino, ya que genera alteraciones a nivel de la inmunidad celular [44,48]. La vulvovaginitis micótica ocurre con mayor frecuencia en mujeres con microbiota vaginal predominada por lactobacilos y podría asociarse a morfología celular alterada. En la

presente investigación, 3/4 casos con infección por *Candida* spp mostraron ASC-US y 1/4 presentó ASC-H. Por otro lado, 2/4 casos presentaron citólisis asociada a infección por *Candida* spp y a su vez, anomalías en células epiteliales, coincidiendo con la literatura [44]. Se ha sugerido que existe una relación importante entre la infección por *Chlamydia trachomatis* y la mayor posibilidad de desarrollar cáncer cervical, especialmente si se asocia a HPV [19,24]. Por tanto, estas pacientes requieren de mayor atención clínica, con la ratificación y resolución correspondiente de su estado de disbiosis. Citológicamente, las características de algunas infecciones genitales están bien establecidas por el sistema Bethesda 2014 [11], sin embargo, no ocurre igual con la cervicitis ocasionada por *Chlamydia*. Autores establecen que dicha infección puede ser sugerida cuando se observan vacuolas citoplasmáticas de membrana reforzada en células metaplásicas [50]. En esta investigación, la infección por *Chlamydia trachomatis* fue sugerida en 2 casos (5,71%) y su asociación con el desarrollo de anomalías en células epiteliales mostró diferencias estadísticamente significativas. *Chlamydia trachomatis* se ha identificado como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y se asocia con infección por HPV, ya que es capaz de desencadenar infecciones crónicas o recurrentes e inflamación a largo plazo, provoca daño epitelial, especialmente en la zona de transformación y afecta la inmunidad celular, facilitando así la transmisión y coinfección viral [3,19,24]. Los 2/35 casos con infección por este organismo presentaron una citología atípica (ASC-H), lo que corrobora lo sugerido por Choi y Roh 2014 [51], que las pacientes con infección por *Chlamydia trachomatis* podrían contribuir en la aparición de anomalías celulares, con el posterior desarrollo de SIL y cáncer invasivo, por lo que ameritan la confirmación microbiológica y tratamiento inmediato.

En el contexto de la disbiosis, se ha sugerido que la inflamación crónica podría ser un cofactor en el inicio de la carcinogénesis cervical, ya que la alteración de la microbiota vaginal aumenta el riesgo o predispone a contraer infección por HPV. En esta investigación, 21/35 casos que presentaron

anomalías en células epiteliales escamosas y/o glandulares mostraron una reacción inflamatoria moderada y marcada, en respuesta a un proceso infeccioso. La composición de la microbiota vaginal influye en la respuesta inmune innata del huésped, la susceptibilidad a la infección y el posterior desarrollo de enfermedad cervical. La CST IV muestra perfiles pro-inflamatorios que mejoran el potencial oncogénico del HPV, a través de la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7, cuya función principal es inhibir la apoptosis y aumentar la proliferación celular, la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, asociadas a displasia y cáncer de cuello uterino (3,40). La posible asociación entre la disbiosis y la adquisición y persistencia de HPV oncogénico, así como el posterior desarrollo de carcinogénesis sigue siendo estudiada por numerosos autores [15,18,19,20-23,52], ya que las infecciones genitales persistentes generan un estado inflamatorio sostenido que conduce a una alteración a nivel celular y molecular, pérdida de la continuidad de la barrera del epitelio con daño tisular, que a su vez podría favorecer el ingreso del HPV oncogénico hasta el estrato epitelial profundo, promoviendo un ambiente para el desarrollo tumoral.

Entre los factores de riesgo que estarían asociados a la adquisición o a la existencia de disbiosis, considerados en esta investigación, destacan la leucorrea y el uso de DIU. La presencia de leucorrea está asociada a infección genital y es el motivo más común de consulta ginecológica, con alta prevalencia de cultivos microbiológicos positivos. En esta investigación, la presencia de leucorrea tuvo un OR igual a 1,109 (IC del 95%; 1,047-1,175) considerándose un factor de riesgo para la presencia de disbiosis. Esto permite concluir que ante la presencia de leucorrea es preciso descartar una infección de transmisión sexual [36,38]. Se ha relacionado la presencia de *Actinomyces* spp en la citología cervical con la presencia del DIU, hasta en un 25%, cuya explicación aún no ha sido aclarada [11,29]. En concordancia con lo señalado en la literatura, en esta investigación el uso de DIU tuvo un OR igual a 0,128 (IC del 95%; 1,056-1,206), considerándolo un factor de riesgo para el

desarrollo de infecciones cervico-vaginales, especialmente la causada por *Actinomyces* spp. Por lo que, en usuarias del DIU es necesario descartar disbiosis y su posible efecto sobre el microambiente cervico-vaginal.

Las infecciones cervico-vaginales son un factor de riesgo para el desarrollo de anomalías en células epiteliales escamosas y/o glandulares en esta localidad, como lo revela el 94,4% de las anomalías en células epiteliales de este estudio que presentaban asociado un proceso infeccioso, con un riesgo relativo (RR: 1,167; IC del 95%; 1,073-1,269). Este hallazgo concuerda con Alotaibi y cols 2020 [53], quienes detectaron una correlación significativa entre la presencia de organismos de transmisión sexual, incluyendo el *HPV* oncogénico, y la citología cervical anormal, concluyendo que las infecciones de transmisión sexual podrían desempeñar un papel crucial en la persistencia del *HPV* oncogénico y la carcinogénesis del cuello uterino. A propósito, actualmente se investiga intensamente las interacciones entre el microbioma humano y la carcinogénesis en diferentes órganos corporales, denominado onco-bioma, por lo que el estudio de la disbiosis cervico-vaginal es de interés en la construcción del onco-bioma del cuello uterino [19,54].

## CONCLUSIONES

En base a todos estos hallazgos y como preámbulo de investigaciones multidisciplinarias futuras, se sugiere combatir oportunamente los estados de disbiosis cervico-vaginal detectados inicialmente mediante el estudio citológico durante la pesquisa de cáncer de cuello uterino, realizando estudios específicos inmediatos bacteriológicos, parasitológicos, micológicos y de biología molecular, a fin de caracterizar tanto la microbiota vaginal habitual como los organismos patógenos más comunes causantes de disbiosis, incluyendo los genotipos específicos de *HPV*, y así determinar su posible implicación en la carcinogénesis del cuello uterino en esta localidad. La disbiosis cervico-vaginal podría ser un cofactor importante en el inicio de la carcinogénesis cervical,

suposición que debe aclararse en las mujeres merideñas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition ISBN 978-92-4-003082-4 (electronic version). ISBN 978-92-4-003083-1 (print version)<sup>®</sup>. World Health Organization 2021.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249. doi: 10.3322/caac.21660
- [3] Doorbar J, Jenkins D, Stoler MH, Bergeron C. Cap. 5: Biology of the human papillomavirus life cycle: the basis for understanding the pathology of precancer and cancer. Pag:67-80. In: *Human Papillomavirus Proving and Using a Viral Cause for Cancer*. Jenkins D, Bosch FX. Editors. London (United Kingdom); Elsevier Academic Press; 2020. ISBN: 978-0-12-814457-2.
- [4] Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, Cone RA, Tachedjian G. Antimicrobial and immune modulatory effect infección de transmisión sexual of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* 2015; 6: 164. doi: 10.3389/fphys.2015.00164..
- [5] Torcia MG. Interplay among vaginal microbiome, immune response and sexually transmitted viral infections. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 266. doi:10.3390/ijms20020266
- [6] Wang Y, Wang X, Zhu M, Ge L, Liu X, Su K, Chen Z and Zhao W (2022) The interplay between cervicovaginal microbial dysbiosis and cervicovaginal immunity. *Front. Immunol.* 2020; 13: 857299. doi: 10.3389/fimmu.2022.857299
- [7] Vázquez F, Fernández-Blázquez A y García B.

- Vaginosis. Microbiota vaginal. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019; 37(9): 592–601.
- [8] Ravel J, Pawel G, Zaid A, Schneider GM, Koenig SK, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(1): 4680-4687. doi: 10.1073/pnas.1002611107 doi:10.1155/2019/1987935
- [9] Plisko O, Zodzika J, Jermakova I, Pcolkina K, Prusakevica A, Liepniece-Karele I, Donders GGG; Rezeberga D. Aerobic vaginitis-underestimated risk factor for cervical intraepithelial neoplasia. Diagnostics. 2021; 11: 97. doi org/10.3390/diagnostics11010097
- [10] Manzanares-Leal GL, Coronel-Martínez JA, Rodríguez-Morales M, Rangel-Cuevas I, Bustamante-Montes LP, Sandoval-Trujillo H, Ramírez-Durá N. Preliminary identification of the aerobic cervicovaginal microbiota in mexican women with cervical cancer as the first step towards metagenomic studies. front. Cell. Infect. Microbiol. 2022; 12: 838491. doi: 10.3389/fcimb.2022.838491
- [11] Nayar R, Wilbur DC. Editors. The Bethesda system for reporting cervical cytology definitions, criteria, and explanatory notes. 3rd ed. Gewerbestrasse (Switzerland): Springer; 2015. ISBN 978-3-319-11074-5.
- [12] Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. Research in Microbiology. 2017; 168: 782e792.
- [13] Yang X, Da M, Zhang W, Qi Q, Zhang C, Han S. Role of *Lactobacillus* in cervical cancer. Cancer Manag Res. 2018; 10: 1219-1229. doi: 10.2147/CMAR.S165228.
- [14] Edwards VL, Smith SB, McComb EJ, Tamarelle J, Ma B, Humphrys MS, Gajer P, Gwilliam K, Schaefer AM, Lai SK, Terplan M, Mark KS, Brotman RM, Forney LJ, Bavoil PM, Ravel J. 2019. The cervicovaginal microbiotahost interaction modulates *Chlamydia trachomatis* infection. ASM Journals. mBio. 10(4):e01548-19. doi:org/10.1128/mBio.01548-19
- [15] Xu X, Zhang Y, Yu L, Shi L, Min M, Xiong L, Pan J, Liu P, Wu G, Gao G. A cross-sectional analysis about bacterial vaginosis, high-risk human papillomavirus infection, and cervical intraepithelial neoplasia in Chinese women. Sci Rep. 2022; 12: 6609. doi: 10.1038/s41598-022-10532-1
- [16] Mitra A, MacIntyre D, Marchesi J, Lee Y, Bennett P, Kirgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? Microbiome. 2016; 4: 58. doi: 10.1186/s40168-016-0203-0.
- [17] Perazzi BE, Payalef SN, Gomez CF, Reyes AP, Guridi L, Losada M, Blanco A, Caruso R, Cora EM, Susuki V, Tinirello MA, Cardinal L, Maldonado V, Fleider L, Vay C, Diaz L, Famiglietti A, Tatti S. Caracterización de la microbiota vaginal en mujeres con lesiones producidas por el virus del papiloma humano. ByPC. 2020; 84(2): 34-42.
- [18] Liang Y, Chen M, Qin L, Wan B, Wang H. A meta-analysis of the relationship between vaginal microecology, human papillomavirus infection endocervical intraepithelial neoplasia. Infect Agent Cancer. 2019; 14: 29. doi: 10.1186/s13027-019-0243-8
- [19] Chen H, Luo L, Wen Y, He B, Ling H, Shui J, He P, Hou X, Tang S and Li Z. *Chlamydia trachomatis* and human papillomavirus infection in women from southern hunan province in china: a large observational study. front. Microbiol. 2020; 11: 827. doi: 10.3389/fmicb.2020.00827.
- [20] Klein C, Kahesa C, Mwaeselage J, West JT, Wood C and Angeletti PC. How the cervical microbiota contributes to cervical cancer risk in sub-saharan africa. front. cell. Infect. Microbiol. 2020; 10: 23. doi:10.3389/fcimb.2020.00023.
- [21] Usyk M, Zolnik CP, Castle PE, Porras C, Herrero R, Gradissimo A, Gonzalez P, Safaeian M, Schiffman M, Burk RD. Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. Cervico vaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. PLoS

- Pathog. 2020; 16: e1008376. doi: org/10.1371/journal.ppat.1008376.
- [22] Kang GU, Jung DR, Lee, YH, Jeon, SY Han, HS, Chong, GO, Shin JH. Potential association between vaginal microbiota and cervical carcinogenesis in Korean women: A cohort study. *Microorganisms*. 2021; 9; 2 94. doi: org/10.3390/microorganisms9020294
- [23] Nieves-Ramírez ME, Partida-Rodríguez O, Moran P, Serrano-Vázquez A, Pérez-Juárez H, Pérez-Rodríguez ME, Arrieta MC, Ximénez-García C, Finlay BB. Cervical squamous intraepithelial lesions are associated with differences in the vaginal microbiota of Mexican women. *Microbiol Spectr*. 2021; 9: e00143-21. doi: org/10.1128/Spectrum.00143-21
- [24] Kumari S, Bhor VM. Association of cervicovaginal dysbiosis mediated HPV infection with cervical intraepithelial neoplasia. *Microb Pathog*. 2021; 152: 104780. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104780
- [25] Caselli E, D'Accolti M, Santi E, Soffritti I, Conzadori S, Mazzacane S, Greco P, Contini C and Bonaccorsi G. Vaginal microbiota and cytokine microenvironment in HPV clearance/persistence in women surgically treated for cervical intraepithelial neoplasia: an observational prospective study. *front. cell. infect. Microbiol*. 2020; 10: 540900. doi: 10.3389/fcimb.2020.540900
- [26] Nicolò S, Tanturli M, Mattiuz G, Antonelli A, Baccani I, Bonaiuto C, Baldi S, Nannini G, Menicatti M, Bartolucci G, Rossolini GM, Amedei A, Torcia MG. Vaginal Lactobacilli and Vaginal Dysbiosis-Associated bacteria differently affect cervical epithelial and immune homeostasis and anti-viral defenses. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 6487. doi: 10.3390/ijms22126487
- [27] Villaseca R, Ovalle A, Amaya F, et al. Vaginal infections in a Family Health Clinic in the Metropolitan Region, Chile. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 2015; 32: 30-36. doi: 10.4067/s0716-10182015000200007
- [28] Francis SC, Mthiyane TN, Baisley K, Mchunu SL, Ferguson JB, Smit T, Crucitti T, Gareta D, SDlamini S, Mutevedzi T, Seeley J, Pillay D, McGrath M, Shahmanesh M. Prevalence of sexually transmitted infections among young people in South Africa: A nested survey in a health and demographic surveillance site. *PLoS Med*. 2018; 15: e1002512. doi: 10.1371/journal.pmed.1002512
- [29] Guillén M, Moreno F, López M, Omaña T, Altuve F, Toro M. Hallazgos microbiológicos cervicovaginales en pacientes de pesquisa de cáncer. *Rev. Fac. Farm*. 2003; 45: 8-12.
- [30] Zhang T, Yue T, Xiong L, Wang X, Wang W, Liu Y, An R. Characteristics of aerobic vaginitis among women in Xi'an district: a hospital-based study. *BMC Women's Health*. 2020; 20: 138. doi: 10.1186/s12905-020-00997-5
- [31] Brusselaers N, Shrestha S, van de Wijgert J, Verstraelen H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2019; 221: 9-18e8. doi: 10.1016/j.ajog.2018.12.011.
- [32] Kumar N, Gupta R, Gupta S. Inadequate clinical data on Pap test request form: Where are we headed in the era of precision medicine? *Cyto Journal*. 2019; 17: 1. doi: 10.25259/Cytojournal\_87\_2019
- [33] Costa DB, Carvalho ARBA, Chaves MAF, Plewka J, Turkiewicz M. Patient safety by analyzing the information not provided in the requisition orders of cervical cytology test. *J Bras Patol Med Lab*. 2018; 54: 401-406.
- [34] Jahic M, Mulavdic M, Nurkic J, Jahic E, Nurkic M. Clinical characteristics of aerobic vaginitis and infection de transmisión sexual association to vaginal candidiasis, trichomonas vaginitis and bacterial vaginosis. *Med Arh*. 2013; 67: 428-430. doi: 10.5455/medarh.2013.67.428-430.
- [35] Nadembega C, Djigma F, Ouermi D, Karou S, Simpore J. Prevalence of vaginal infection in 15 to 24 years women in Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Appl. Pharm. Sci*. 2017; 7: 209-213. doi:

- 10.7324/JAPS.2017.70131 ISSN 2231-3354
- [36] López-Olmos, J. Leucorreas: valores predictivos de la citología cervicovaginal y del cultivo microbiológico para el diagnóstico de la infección vaginal. *Clin Invest Gin Obst.* 2013; 40: 200-206.
- [37] Sánchez-Hernández JA, Castellanos-Vázquez S, Rivera-Tapia JA. Leucorrea como signo de infecciones cervicovaginales. *Rev. Costarric. Salud Pública.*, 2013; 22: 56-60.
- [38] Ozal-Mora N. Infecciones del tracto genital inferior: descarga vaginal. *Rev Obstet Ginecol Venez.*, 2019; 79: 98-107.
- [39] Baka S., Chasiakou A., Politi E., Gennimata V, Kouskoumi E. Inflammation on the cervical papanicolaou smear: evidence for infection in asymptomatic women?. *Hindawi Publishing Corporation Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2013; 2013: 184302. doi: 10.1155/2013/184302
- [40] Murata M. Inflammation and cáncer. *Murata Environmental Health and Preventive Medicine.* 2018; 23: 50. doi: 10.1186/s12199-018-0740-1.
- [41] Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome.* 2016; 4: 58. doi: 10.1186/s40168-016-0203-0
- [42] Kalia N, Singh J, Manpreet Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 2020; 19: 5. doi: 10.1186/s12941-020-0347-4
- [43] Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki A. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Transl Res.* 2017; 179: 168–182. doi:10.1016/j.trsl.2016.07.004
- [44] Han Y, Liu Z and Chen T. Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 643422. doi: 10.3389/fmicb.2021.643422
- [45] Ameyapoh AH, Katawa G, Ritter M, Tchopba CN, Tchadié PE. Infection of transmisión sexual K, Kamassa HE, Mazou B, Amessoudji OM, N'djao A, Agoro S, Vogelbusch C, Omondi MA, Kolou M, Karou SD, Horsnell W, Hoerauf A, Ameyapoh Y, Layland LE. Hookworm infections and sociodemographic factors associated with female reproductive tract infections in rural areas of the central region of Togo. *Front Microbiol.* 2021; 3(12): 738894. doi: 10.3389/fmicb.2021.738894.
- [46] Majigo M, Kashindye P, Mtulo Z and Joachim A. Bacterial vaginosis, the leading cause of genital discharge among women presenting with vaginal infection in Dares Salaam, Tanzania. *Afr Health Sci.*, 2021; 21: 531-537. doi: 10.4314/ahs.v21i2.7
- [47] Mirabello L, Clarke M, Nelson C, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, Cullen M, Boland J, Schiffman and Burk R. The intersection of HPV epidemiology, genomics and mechanistic studies of HPV-mediated Carcinogenesis. *Viruses.* 2018; 10: 80. doi:10.3390/v10020080
- [48] Bouchemal K, Bories C, Loiseau PM. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. *Clin Microbiol Rev.*, 2017; 30: 811–825. doi:org/10.1128/CMR.00109-16
- [49] Fichorova RN, Morrison CS, Chen P-L, Yamamoto HS, Govender Y, Junaid D. Aberrant cervical innate immunity predicinfección of transmisión sexual onset of dysbiosis and sexually transmitted infections in women of reproductive age. *PLoS ONE.* 2020; 15: e0224359. doi:org/10.1371/journal.pone.0224359
- [50] Escobar-Botero S, Galeano-Múnica A, Londoño-Restrepo M, Villa-Giraldo M. Atlas de citología cervicovaginal. Pags:48-51. Editor: Universidad de Antioquía, Colombia (Antioquia). 2004. ISBN9586557731.
- [51] Choi Y, Roh J. Cervical Cytopathological findings in Korean women with *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* Infections. *Scientific World Journal.* 2014; 2014: 756713. doi:10.1155/2014/756713

[52] Ananhtar M, Gootenberg D, Mitchell C, and Kwon D. Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity. *Cell Host Microbe*. 2018; 23: 159-168. doi: 10.1016/j.chom.2018.01.013.

[53] Alotaibi H.J., Almajhdi F.N, Alsaleh A.N., Obeid D.A, Khayat H.H, Al- Muammer T.A., Tulbah A.M., Alfageeh M.B., Al-Ahdal M.N., Alhamlan F.S. Association of sexually transmitted infections and human papillomavirus co-infection with abnormal cervical cytology among women in Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci.*, 2020; 27: 1587-1595. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.03.021

[54] Astudillo-de la Vega H, Alonso-Luna O, Ali-Pérez J, López-Camarillo C, Ruiz-García E. Oncobiome at the Forefront of a Novel Molecular Mechanism to Understand the

Microbiome and Cancer. *Adv Exp Med Biol.*, 2019; 1168: 147-156. doi: 10.1007/978-3-030-24100-1\_10

**Greca Erazo Nieto:** Estudiante de la Licenciatura en Bioanálisis. Pasantías y defensa de Trabajo de Grado aprobadas. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Asistente de Laboratorio Clínico. **ORCID iD:** <https://orcid.org/0000-0001-8928-6444>.

**Morelva Toro de Méndez:** Licenciada en Bioanálisis. Especialista en Citología Ginecológica y Mamaria. Doctora en Patología de los Tumores Humanos. Profesora Titular Cátedra de Citología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Coordinadora “Grupo de Investigaciones Citológicas”. Universidad de Los Andes. **ORCID iD:** <https://orcid.org/0000-0001-7352-7397>.

Artículo original

# Estudio fitoquímico preliminar, evaluación de las actividades antioxidante y ecotóxica de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L (SOLANACEAE).

Preliminary phytochemical study, evaluation of the antioxidant and ecotoxic activities of methanolic extracts from the aerial parts of *Physalis peruviana* L (SOLANACEAE).

Contreras Carlos<sup>1</sup>, Morillo Marielba<sup>1\*</sup>, Visbal Tomás<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de investigación "Ecología y Nutrición", Departamento de Ciencia de Los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, C.P. 5101 Venezuela.

Recibido: septiembre de 2022-Aceptado: octubre de 2022

## RESUMEN

*Physalis peruviana* L., pertenece a la familia Solanaceae, es conocida en Venezuela con el nombre de topo-topo, esta especie tiene gran interés en la medicina tradicional, el objetivo del presente estudio fue determinar la composición química preliminar del extracto metanólico de las hojas (EMH), el extracto metanólico de los tallos (EMT), y el extracto metanólico de las flores (EMF) de esta especie, evaluar la actividad antioxidante (método DPPH) y ecotóxica sobre *Artemia salina*. En cuanto a la composición química los EMH y EMT, mostraron, la presencia de alcaloides, fenoles y esteroides, mientras que en el EMF únicamente se evidenció la presencia de esteroides. En cuanto a la actividad antioxidante, solamente el EMH mostró % I de 26,9 a su máxima dilución de 0,5 mg/mL en comparación de 96,1 del ácido ascórbico. La evaluación de la toxicidad sobre nauplios de *A. salina* según el CYTED, determinó que los EMH son relativamente inocuos, EMT son moderadamente tóxico y EMF inocuos. Es importante destacar que en este trabajo se reporta por primera vez la actividad ecotóxica de la especie *P. peruviana* recolectada en Mérida, Venezuela, sobre nauplios de *A. salina* por lo que se considera un aporte al estudio de esta especie.

## PALABRAS CLAVE

*Physalis peruviana*, Solanaceae, actividad antioxidante, ecotoxicidad.

## ABSTRACT

*Physalis peruviana* L. belongs to the Solanaceae family and is known in Venezuela by the name of topo-topo, this species is of great interest in traditional medicine, and the objective of this study was to determine the preliminary chemical composition of the methanolic extract of the leaves (MEL), methanolic extract of the stems (MES), and methanolic extract of the flowers (MEF) of this species, to evaluate the antioxidant (DPPH method) and ecotoxic activity on *Artemia salina*. Regarding the chemical composition, the MEL and MES showed the presence of alkaloids, phenols, and sterols, while in the MEF only the presence of sterols was evidenced. Regarding antioxidant activity, only MEL showed a %I of 26.9 at its maximum dilution of 0.5 mg/mL compared to 96.1 for ascorbic acid. The evaluation of the toxicity on nauplii of *A. salina* according to CYTED, determined that MEL is relatively innocuous, MES is moderately toxic and MEF innocuous. It is important to highlight that in this

work the ecotoxic activity of the species *P. peruviana* collected in Mérida, Venezuela, on nauplii of *A. salina* is reported for the first time, so it is considered a contribution to the study of this species.

## KEY WORDS

*Physalis peruviana*, Solanaceae, antioxidant activity, ecotoxicity.

## INTRODUCCIÓN

Las Solanaceas son una familia de plantas herbáceas o leñosas con hojas alternas, simple y sin estipulas pertenecientes al orden Solanales. Se encuentra distribuida en diferentes hábitats y con morfología muy variada. La familia se distribuye por casi todo el planeta con la excepción de la Antártida. La mayor diversidad de especies se ha registrado en América del Sur y América Central [1].

El género *Physalis* (familia Solanaceae), incluye entre 80 y 100 especies herbáceas perennes y anuales cuyos frutos se forman y permanecen dentro del cáliz; casi todas en estado silvestre y muy pocas en estado semi-silvestre, siendo la *Physalis peruviana* la más utilizada por su fruto dulce [2-4].

*Physalis peruviana* L., es conocida como tope-tope en Venezuela, uchuva en Colombia, uvilla en Ecuador y aguaymanto en Perú. Es un cultivo herbáceo originario de la región andina y utilizado fundamentalmente por sus frutos comestibles, los cuales corresponden a una baya jugosa, redondeada, entre 1,25 y 2 cm de diámetro, habitualmente de color amarillo y de intenso sabor, esta fruta crece dentro de un cáliz que lo protege contra insectos, aves, patógenos y condiciones climáticas extremas [5], el cultivo de *P. peruviana* L. se extiende por todo la cordillera de los Andes, única de Sur América y desde hace dos décadas se expenden en los mercados del área andina, desde Venezuela a Chile [6].

Llumiguano (2014) [7], estudió la composición química de los extractos etanólico, etéreo y acuoso de hojas de *P. peruviana*, y comprobó la presencia de alcaloides, triterpenos y compuestos fenólicos,

que podrían estar relacionados con la actividad farmacológica de esta planta. Además, se han identificado en el género *Physalis* aproximadamente 351 witanólidos, principalmente aislados de las especies de *P. angulata* y *P. peruviana*, estos compuestos son esteroides con un esqueleto de ergostano, es decir, lactonas esteroidales [8], que han demostrado tener diversas actividades biológicas, como anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana, inmunorreguladora, tripanocida y leishmanicida. Las funciones farmacológicas observadas en estos compuestos han apoyado los usos de especies de *Physalis* en medicinas tradicionales [9]. En los últimos años se aislaron de *P. peruviana* L., cuatro nuevos witanolidos conocidos como Peruranolidos A-D, con potencial actividad antibacteriana y citotóxica [10].

A la especie *P. peruviana* L., se le atribuyen propiedades como antiespasmódico, diurético, antiséptico, sedante, analgésico, fortalecimiento del nervio óptico, antiparasitario, antidiabético [11]. Por otra parte, la caracterización bromatológica y fisicoquímica de *P. peruviana* L. ha despertado el interés de esta especie de ser utilizada, como alimento nutraceutico [12].

El fruto de *P. peruviana* L., es considerado exótico y es ampliamente conocido por sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y medicinales, igualmente, los cálices que protegen el fruto han demostrado tener propiedades anticancerígena, antimicrobiana, antipirética, diurética, inmunomoduladora y antiinflamatoria (Franco y cols., 2007), estas actividades han sido comprobadas por estudios realizados in vivo [13-15].

Los extractos de las hojas de *P. peruviana* han mostrado importantes actividades antibióticas, antioxidantes y antiinflamatorias [14,16]. Además, Toro y cols. (2014) [17], comprobaron que el extracto etanólico crudo y algunas fracciones de cáliz tienen actividades antiinflamatoria y antioxidante. También, Ezzat y cols. (2021) [18], determinaron que la fracción rica en fenoles de *P. peruviana* L., podría prevenir la nefropatía diabética, demostrando el efecto renoprotector de esta especie contra las complicaciones ocasionadas por la diabetes; particularmente nefropatía. Igualmente, Baker y Mohammed (2022) [19],

demonstraron que la fracción rica en polifenoles de los cálices de esta especie y su nanoemulsión podrían ser eficaces para el tratamiento del carcinoma hepatocelular (CHC).

En cuanto a su actividad ecotóxica, Sanabria y cols. (1997) [20], estudiaron los compuestos fitoquímicos y letalidad sobre *A. salina* de 29 especies colombianas, entre ellas *Physalis peruviana* L., determinaron que el extracto etanólico que habían evidenciado la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y/o triterpenos y lactonas terpénicas mostraron tener alta letalidad frente a la *A. salina* y relacionaron la presencia de estos compuestos químicos con dicha toxicidad.

En la presente investigación se planteó realizar el estudio fitoquímico cualitativo para determinar la actividad antioxidante y toxicidad sobre *A. salina* de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* recolectada en Mérida, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección de la muestra:** Las hojas, tallos y frutos de *P. peruviana* L., fueron recolectadas en el sector El Arado 2, El Valle, Municipio Libertador estado Mérida, a 1400 m. s. n. m, la identificación botánica la realizó el Ing. Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, el voucher (02) fue depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

**Obtención de los extractos:** Para este estudio se tomó aproximadamente un kilogramo de hojas, de tallos y frutos respectivamente, se procedió a secar en una estufa a 45 °C por 48 horas. Luego se tomó 200 g de cada uno de los materiales vegetales (secos y molidos) y se colocaron en un erlenmeyer con aproximadamente 200 mL de metanol (para extraer los componentes del material vegetal a través de maceración a temperatura ambiente). Este proceso se repitió 3 veces, para cada uno, se filtró y se evaporó para recuperar el metanol, se obtuvieron los tres extractos: Extracto metanólico de las hojas (**EMH**), extracto metanólico de los

tallos (**EMT**) y extracto metanólico de los frutos (**EMF**), estos se almacenaron en frascos herméticamente cerrados, previamente rotulados y tarados.

**Estudio fitoquímico preliminar:** Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en **EMH**, **EMT** y **EMF** de *P. peruviana* L., se efectuó una serie de pruebas químicas cualitativas siguiendo la metodología descrita [21].

**Actividad antioxidante método DPPH•:** Todos los reactivos químicos utilizados, incluyendo los disolventes fueron de grado analítico. El reactivo DPPH• (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo) es de Sigma-Aldrich, el ácido ascórbico y metanol se obtuvieron de Merck. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Spectronic GeneSystem 10 Bio, para evaluar el comportamiento de los extractos como agentes antioxidantes. La evaluación de la capacidad antioxidante de **EMH**, **EMT** y **EMF** de *P. peruviana* L., se realizaron siguiendo el ensayo del test de actividad secuestrante de radicales libres del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (**DPPH•**), según la metodología descrita [22-26].

Esta técnica consistió en preparar una solución madre de cada uno de los extractos, tomando 4 mg de cada uno, en tubos eppendorf y se disolvieron en 1 mL de metanol, el ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los extractos, para tal fin, se prepararon 3 tubos de cada uno, que contenían 700 µL de **DPPH•** ( $6 \times 10^{-2}$  mM) y 300 µL del extracto, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 min, después se procedió a determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm, con cada uno de los extractos que presentaron un porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH• igual o superior a 50 a 4 mg/mL, se preparó una solución madre de concentración de 1 mg/mL y a partir de la misma se prepararon varias diluciones (0,5; 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05 mg/mL) y se procedió a determinar la actividad antioxidante. Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico ( $Y = 0.8984X + 5.45$ ,  $R^2 = 0,9936$ ), partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol). El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de **DPPH•** se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{(A \text{ DPPH} - A \text{ Extracto})}{A \text{ DPPH}} * 100$$

En función de la concentración del analito se calculó por regresión lineal para cada muestra la concentración eficiente 50 (CE<sub>50</sub>).

**Toxicidad en *Artemia salina*:** La evaluación de toxicidad sobre nauplios de *A. salina* de **EMH**, **EMT** y **EMF** de *P. peruviana* L. se realizó en el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, este método estándar se basa en la determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), es decir, concentración que causa la muerte al 50% de una población de nauplios, en 24 h.

**Reactivos:** Los reactivos utilizados para evaluar la toxicidad de **EMH**, **EMT** y **EMF** frente a *A. salina*, de marca Sigma-Aldrich y Merck fueron: cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio hexahidratado (MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y dodecil sulfato de sodio, levadura comercial y quistes del crustáceo *A. salina* (Brine Shrimp Egg. *Artemia* cysts O.S.I. Pro 100. Ocean Star International. INC. Snowville. UT 84336. EE.UU.). En el desarrollo del bioensayo, primero se preparó una solución marina de aproximadamente 1000 mL (agua de mar artificial), que proporcionó las condiciones necesarias para el desarrollo de los nauplios de *Artemia*. Esta solución se mantuvo en aireación constante (burbujeo) 72 h previas al bioensayo, con la finalidad de oxigenar la misma [27].

**Eclosión de los quistes:** Al finalizar el tiempo de aireación de la solución marina (72 h) se dividió la solución en dos recipientes (fiolas) con 500 mL aproximadamente en cada una, en una se añadió alrededor de 250 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de 28 ± 2 °C por 48 h. La solución marina libre de nauplios, se utilizó como disolvente para preparar las diferentes diluciones del extracto etanólico y llenado de las placas [27].

**Desarrollo de la prueba:** Se colocaron 130 µL de solución salina (aireada) en cada pozo de una placa de microtitulación, posteriormente, se agregaron a cada pozo 10 µL de solución que

contenían entre 10 y 15 nauplios de *A. salina*, luego se le adicionó 10 µL de una solución de levadura comercial marca Fleischmann (5 mg/mL) a cada pozo y se incubaron las placas en un área con iluminación permanente por 24 h para excitar su actividad metabólica. Finalmente, se colocaron 50 µL del extracto etanólico, a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 ppm). El extracto se diluyó en solución salina: DMSO (9:1). Se incluyó, además, un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar) y un grupo control positivo (Dodecil sulfato de sodio al 10%) con 6 réplicas para cada grupo. Se registraron el número de nauplios presentes inicialmente en cada pozo (NV), y al cabo de 24 h de contacto con los extractos se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM). Se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación: porcentaje de letalidad (I%) [21]:

$$\%L = \frac{NM}{NV} * 100$$

Se determinó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) con un intervalo de confianza del 95%, se usó el método de análisis Probit y el programa estadístico SPSS, 21.0 para Windows. Se clasificaron la DL<sub>50</sub> de los extractos evaluados según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones el Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo (CYTED) [28].

**Estudio estadístico:** Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Para determinar diferencias estadísticas en cada uno de los analitos evaluados con la actividad antioxidante por el método de **DPPH** se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, como valores de media (n=3) y desviación estándar (SD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L:** Se llevó a cabo una serie de pruebas para conocer cualitativamente los compuestos

químicos presentes en EMH, EMT y EMF de *P. peruviana* L. (Tabla 1).

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de varios metabolitos secundarios de interés biológico tanto en hojas, tallos y frutos de

*P. peruviana* L., donde se observó una importante presencia de alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en **EMH** y **EMT**, mientras que los **EMF** solo se determinó la presencia de esteroides (Tabla 1).

**TABLA 1.**  
Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.

Metabolitos Secundarios	Reacción	EMH	EMT	EMF
Alcaloides	Dragendorff	+	+	-
	Wagner	+	+	-
	Mayer	+	+	-
Esteroides	Liebermann-Burchard	+++	+	++
Compuestos Fenólicos	Fe-Cl <sub>3</sub>	+++	+++	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de La espuma	-	-	-
Taninos	Prueba de gelatina	-	-	-
Cumarinas y quinonas	Luz UV	-	-	-

Esta investigación se correlaciona con la realizada por Llumiguano (2014) [7], quien reportó la presencia de alcaloides, triterpenos, catequinas, azúcares reductores, fenoles y flavonoides en el extracto etanólico de las hojas; alcaloides y triterpenos en el extracto etéreo; alcaloides, azúcares reductores y fenoles en el extracto acuoso. De igual forma, Hernández (2015) [29], analizó las hojas de *P. peruviana* L., e indicó la presencia de esteroides, flavonoides, taninos y alcaloides en el extracto etanólico y a su vez relacionaron la presencia de estos compuestos con la actividad biológica.

La diferencia en cuanto a los componentes químicos encontrados quizás pueda deberse a las condiciones climáticas y ubicación geográfica del sitio de recolección de la planta, para entender esta afirmación nos basamos en lo enunciado por Waterman y Mole (1994) [30], quienes aseveraron que el contenido de varios tipos de metabolitos secundarios está influenciado por el genotipo de la planta (especie y variedad), las características ambientales (radiación solar y disponibilidad de agua), madurez, velocidad de crecimiento, condición nutricional del suelo, depredación, enfermedades y mecanismos de defensa de la planta.

Por otra parte, Valares (2011) [31], afirmó que la dependencia de los factores climáticos en la síntesis de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos y fenoles, se debe a que la mayoría de los ecosistemas existen grandes diferencias en las variables meteorológicas a lo largo del año e interanualmente, esto es muy importante ya que afecta a la variabilidad temporal en la producción de metabolitos secundarios.

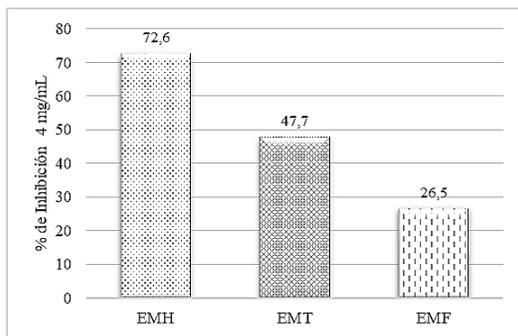
Otro factor importante, a tener en cuenta es que los metabolitos secundarios varían de acuerdo a la edad de la planta, demostrando que el estado de desarrollo de éstas afecta la biosíntesis y acumulación de estos compuestos químicos, siendo las hojas jóvenes las que secretan mayor cantidad de los mismos, durante el crecimiento de la planta y la ontogenia, los metabolitos secundarios pueden cambiar considerablemente, tanto cualitativa como cuantitativamente. En general, estados más juveniles expresan más mecanismos de defensas que edades más maduras, lo cual les puede permitir soportar mejor diferentes tipos de estrés [31,32].

Esto podría explicar el hecho de que en este estudio el extracto metanólico de los frutos de *P. peruviana*, solo evidenció la presencia de esteroides, es posible que la madurez del fruto haya influido sobre el contenido de algunos metabolitos secundarios [33].

**Actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L.:**

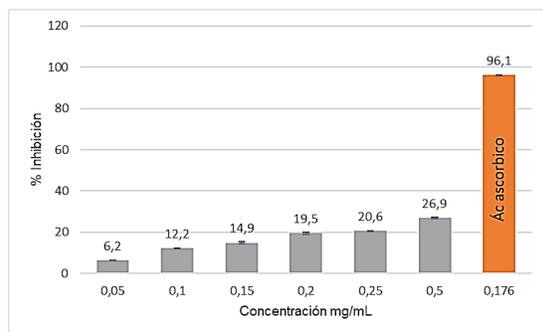
La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH, previamente se realizó un barrido inicial con los extractos metanólicos de hojas, tallos y frutos de *P. peruviana* L., con el fin de conocer si estas poseían potencial antioxidante.

En la Figura 1, se muestran los resultados de la determinación de porcentaje de inhibición (% I), de los extractos metanólicos de las hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L., (barrido inicial) a una concentración de 4 mg/mL.



**Fig. 1.** Porcentaje (%) de inhibición (%I), de los extractos metanólicos de las hojas (EMH), tallos (EMT) y frutos (EMF) de *Physalis peruviana* L., a una concentración de 4 mg/mL.

Con este primer barrido se pudo determinar que el **EMH** de *P. peruviana* L., dio un %I de 72,6%, siendo mayor de 50%, lo cual indicó que tenía actividad antioxidante, mientras que los **EMT** y **EMF** un %I menor al 50% lo que conllevó a descartarlos, por no poseer actividad antioxidante evidente (Fig. 1). Posteriormente la determinación de la actividad antioxidante, se realizó al **EMH** (Fig. 2).



**Fig. 2.** Porcentaje (%) de inhibición del **EMH** de *P. peruviana* L. Existen diferencias estadísticamente significativas entre datos ( $p < 0,05$ ) con un nivel de confianza de 95%

Al utilizar el método **DPPH** se pudo observar y comprobar que la capacidad antioxidante del **EMH** a su máxima concentración de dilución (0,5 mg/mL) fue de 26,9%, en comparación de 96,1% del ácido ascórbico utilizado como control positivo (Fig. 2).

**Concentración eficiente 50 (mg/mL) del EMH de *Physalis peruviana* L.:** Castañeda y cols. (2008) [34], indicó que el fundamento del método **DPPH**, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres. A partir del ensayo con **DPPH**, se obtiene la concentración eficiente (CE), con la cual se disminuye en un 50% la concentración inicial de **DPPH**, la concentración eficiente 50 en mg/mL del **EMH** de *P. peruviana* L., para captar radicales libres es de 1,15 mg/mL, que es considerado un buen resultado a pesar de la ausencia de compuestos químicos como son taninos, flavonoides y la baja concentración de alcaloides reportados.

Para explicar esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Arranz (2010) [35], quien afirmó que la acción biológica de los compuestos fitoquímicos está relacionada con la estructura y concentración de estas sustancias, porque influyen en su biodisponibilidad y bioaccesibilidad. También debemos tener en cuenta que la producción de estos metabolitos secundarios en las hojas de *P. peruviana* L., pudo estar afectada por diversos factores. Sharapin (2000) [36], explica que la producción de compuestos fitoquímicos en las plantas están sujetos a factores extrínsecos como la temperatura, humedad, calidad del suelo, el clima y por factores intrínsecos a nivel genético, que inciden directamente en la producción de metabolitos secundarios.

Debido a esto podemos encontrar una explicación y es que la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides y triterpenos, juegan un papel muy importante en la actividad antioxidante, si lo comparamos con los compuestos encontrados en las hojas como fueron alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos, pero no fue evidente la

presencia de flavonoides y taninos, lo que explica la reservada actividad antioxidante que presentó.

Este estudio difiere al reportado por Aparcana y Villarreal (2014) [16], quienes evaluaron el potencial antioxidante de los frutos de *P. peruviana* L., recolectados en diferentes lugares del Perú como fueron Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca. Encontrando que el extracto etanólico presentaba una CE<sub>50</sub> de 1,86; 2,04; 2,24 y 2,36 mg/mL respectivamente y los compuestos químicos predominantes en su estudio fitoquímico fueron la presencia elevada de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y una leve presencia de saponinas.

De igual manera Cortés y cols. (2015) [12], determinaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los frutos de *Physalis peruviana* L., por el método DPPH, donde alcanzaron concentraciones de 393,69 mg/100 g de muestra liofilizada y 391,39 mg/100 g de muestra deshidratada por calor.

Es importante destacar que, en el presente estudio, los frutos de *P. peruviana* L., no mostraron actividad antioxidante y solo se reportó la presencia de esteroides en los mismos. Por lo cual pudo influir la variedad del fruto, el lugar de cosecha, la altura, las condiciones del suelo, el clima, los nutrientes y el estado de madurez, entre otros factores que influyen al momento de realizar un análisis. Para comprender esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Olivares y cols. (2016) [33], que afirmaron que el grado de madurez de los frutos influye en el contenido de compuestos bioactivos

tales como ácido ascórbico, fenólicos totales, carotenoides totales; así como en la capacidad antioxidante.

Por otra parte, se tienen estudios realizados a otras especies del género *Physalis* quienes reportaron actividad antioxidante como es el estudio de Barrientos y cols. (2018) [37], quienes estudiaron la capacidad antioxidante de *P. chenopodifolia* L., silvestre y cultivado. Determinaron la presencia de fenoles y flavonoides tanto en hojas como en frutos y evaluaron la actividad antioxidante por el método DPPH. La concentración de 500 µg mL<sup>-1</sup> se obtuvo 11,5 ± 0,4 y de 8,28 ± 0,3%, para plantas cultivadas y silvestre, respectivamente. Las demás concentraciones (200 y 100 µg mL<sup>-1</sup>) fueron de 6,45 ± 0,3 y de 4,19 ± 0,2 para plantas cultivadas y de 3,91 ± 0,1 y 2,14 ± 0,1 en plantas silvestres.

Para comprender estas diferencias entre especies, en cuanto a la producción de metabolitos secundarios, Santacoloma y cols. (2014) [38], explicaron que su distribución en las plantas varía entre especies y dentro de la célula vegetal se localizan en las vacuolas citoplasmáticas o en la pared celular.

**Determinación de toxicidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.:** En la Tabla 2, se muestran los resultados del bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, aplicado a los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* L., y los controles sobre *A. salina*.

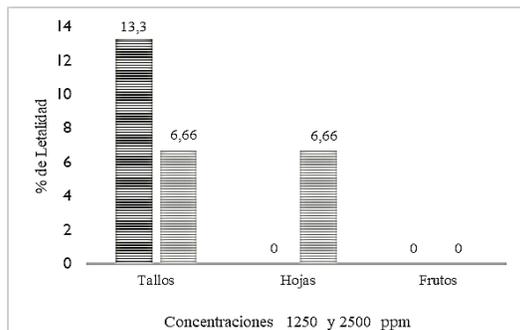
**TABLA 2.**  
Cuantificación de la DL<sub>50</sub> de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* L., y los controles sobre *A. salina*.

Extracto	DL <sub>50</sub> (ppm)	Límite de confianza (95 %) ppm		Categoría según el CYTED
		Límite inferior	Límite superior	
Tallos	438,984	145,187	1183,823	Moderadamente tóxico
Hojas	2551,959	-	-	Relativamente inocuo
Frutos	-	-	-	Inocuo
DMSO	-	-	-	Inocuo
DDSS	23,372	13,507	28,026	Altamente tóxico

DL<sub>50</sub>: Dosis letal 50; signo (-): valores muy altos; DMSO: Dimetilsulfoxido; DDSS: Dodecil sulfato de sodio.

De acuerdo a lo observado en la Tabla 2, se muestra que el **EMH** resultó ser relativamente inocuos, el **EMT** moderadamente tóxico y el **EMF** inocuo según el CYTED, encontrándose en los límites inferiores (dentro de los intervalos de confianza) por encima de 1000 ppm.

En relación al % de letalidad a las concentraciones más alta evaluadas (1250 y 2500 ppm), para los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* L. (Fig. 3), mostraron los siguientes resultados, para el **EMH** 6,66%, **EMT** 13,3% y **EMF** 0%.



**Fig. 3.** % de Letalidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* L., sobre *A. salina* a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Este estudio difiere a lo reportado por Sanabria y col (1997) [20], quienes investigaron 29 especies de plantas colombianas, entre ellas *P. peruviana* L., mostrando que el extracto etanólico a través de análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y/o triterpenos y lactonas terpénicas y a su vez relacionaron la presencia de estos compuestos químicos con la alta letalidad que mostraron estos extractos frente a la *A. salina*. La concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) que presentaron las partes aéreas de *P. peruviana* L., fue de 42  $\mu\text{g/mL}$  lo que indica que es altamente tóxico.

Esta diferencia quizás se debe a que, en el presente estudio, se reportó bajas concentraciones de alcaloides y ausencia de metabolitos secundarios como taninos y saponinas. Para comprender esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Bun y cols. (2009) [39], quienes afirmaron que altas concentraciones de alcaloides aumenta la toxicidad de la planta sobre nauplios de *A. salina*, lo cual puede servir para determinar la toxicidad intrínseca de la planta y así poder

controlar tratamientos seguros y evitar efectos por sobredosis aguda hacia células normales.

Por otra parte, tenemos lo expuesto por Zhao y cols. (1999) [40], quienes evaluaron la toxicidad de varios tipos de saponinas contra *A. salina*, y como resultado encontraron que los compuestos ensayados disminuyeron su toxicidad a medida que las concentraciones de las saponinas analizadas aumentaron. Estos resultados demuestran que las saponinas pueden ser letales a bajas concentraciones, por lo que se recomendaría el uso de *A. salina*, como un valioso bioensayo de toxicidad para evaluar extractos vegetales que contengan bajas concentraciones de compuestos químicos con altas polaridades. En nuestro estudio se observó ausencia de saponina que podría incidir directamente en la baja toxicidad mostrada por los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* L.

Con base en lo expuesto anteriormente, se aprecia una relación entre la presencia de algunos metabolitos secundarios y la letalidad sobre *A. salina*, especialmente de los alcaloides y saponinas. Sin embargo, es claro que la letalidad sobre *A. salina* depende de la concentración de las sustancias, de la presencia de otros metabolitos secundarios no analizados en este trabajo y la interacción entre los mismos

## CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de metabolitos secundarios entre los que destacan alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en los **EMH** y **EMT**, en cuanto al **EMF** solo se determinó la presencia de esteroides. La actividad antioxidante de **EMH** de *P. peruviana* L., mostró a la máxima concentración de dilución un porcentaje de inhibición de 26,9, en comparación de 96,1 del ácido ascórbico y la  $CE_{50}$  ( $\text{mg/mL}$ ) es 1,15  $\text{mg/mL}$ . La evaluación de la toxicidad sobre nauplios de *A. salina* arrojó que el **EMH** es relativamente inocuo, el **EMT** resultó ser moderadamente tóxico, mientras que el **EMF** es inocuo, según el CYTED en relación al % de letalidad a la concentración más alta evaluada (2500 ppm), para **EMH** fue de 6,66%, los **EMT** 13,3% y **EMF** del 0%.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo reconocen y agradecen al Instituto de Investigaciones y al Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Magaña MA, Burelo CM. Uso Medicinal de la Familia Solanaceae en tabasco. *Kuxulkab*. 2010; 16 (30): 33-34.
- [2] Legge A. Notes on the history, cultivation, and uses of *Physalis peruviana* L, *Journal of the Royal Horticultural Society*. 1974; 99(7): 310-314.
- [3] Verheij E, Coronel R. Plant resources of South-East Asia. Editorial Pudoc Wageningen, 1991. 254-256.
- [4] Cedeño M, Montenegro D. Plan exportador, logístico y comercialización de uchuva al mercado de Estados Unidos para frutexpo SCI LTDA. [Tesis de pregrado]. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ingeniería; 2004.
- [5] Fischer G, Herrera A, Almanza PJ. Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) In: Yahia EM. (Ed.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits Acai to citrus. Cambridge: Woodhead Publishing. 2011; 2: 374-396.
- [6] National Research Council (NRC). 1989. Goldenberry (Cape Gooseberry). Washington: National Academy Press; 1989. 241-251.
- [7] Llumiguano, F. Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto de hojas de chapuca o uvilla silvestre (*Physalis peruviana*). En ratas (*Rattus norvegicus*) con hiperglicemia inducida. [tesis de pregrado]. Riobamba Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2014.
- [8] Lock O, Rojas R. Química y Farmacología de *Physalis peruviana* L. ("Aguaymanto"). *Revista de Química*. 2005; 19(2): 65-70.
- [9] Min H, Ji-Xiang H, Hui-Xin H, Kan Z, Xiao-Ning W, Bao-Bing Z, Hong-Xiang L, Dong-Mei R, Tao S. Withanolides from the genus *Physalis*: a review on their phytochemical and pharmacological aspects. *J Pharm Pharmacol*. 2020; 72(5): 649-669
- [10] Li QR, Liang HJ, Li BL, Yuan J, Ao ZY, Fan YW, Zhang WJ, Lian X, Chen JY, Wang JZ, Wu JW. Peruranolides A-D, four new withanolides with potential antibacterial and cytotoxic activity from *Physalis peruviana* L. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022; 27(3):98. doi: 10.31083/j.fbl2703098.
- [11] Rodríguez S, Rodríguez E. Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (Aguaymanto) sobre la glicemia posprandial en adultos jóvenes. *Revista Médica Vallejana*. 2007; 4(1): 43-52.
- [12] Cortés G, Prieto G, Rozo W. Caracterización bromatológica y fisicoquímica de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) y su posible aplicación como alimento natracéutico. *Revista Ciencia en Desarrollo*. 2015; 6(1): 87-97.
- [13] Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R, Ospina LF. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica*. 2007; 27(1): 110-115.
- [14] Franco LA, Matiz GE, Pajaro IB, Gomez H. Actividad Antibacteriana *In Vitro* de Extractos y fracciones de *Physalis peruviana* y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2013; 12 (3): 230-237.
- [15] Castro J, Ocampo Y, Franco L. Cape Gooseberry [*Physalis peruviana* L.]. *Calyces ameliorate* TNBS acid-induced colitis in rats. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2015; 9(11): 1004-1015.
- [16] Aparcana I, Villarreal L. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de *Physalis peruviana* "aguaymanto" de diferentes lugares geográficos del Perú. [tesis de pregrado]. Lima. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
- [17] Toro RM, Aragón DM, Ospina LF, Ramos FA, Castellanos L. Phytochemical analysis,

- antioxidant and anti-inflammatory activity of calyces from *Physalis peruviana*. Nat. Prod. Commun. 2014; 9(11): 1573-1575.
- [18] Ezzat SM, Abdallah HMI, Yassen NN, Radwan RA, Mostafa ES, Salama MM, Salem MA. Phenolics from *Physalis peruviana* fruits ameliorate streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in rats via induction of autophagy and apoptosis regression. Biomed. Pharmacother. 2021; 142, 111948. doi 10.1016/j.biopha.2021.111948
- [19] Baker DHA, Mohammed DM. Polyphenolic rich fraction of *Physalis peruviana* calyces and its nano emulsion induce apoptosis by caspase 3 up-regulation and G2/M arrest in hepatocellular carcinoma. Food Bioscience. 2022; 50(Part A), 102007. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102007>
- [20] Sanabria A, Lopez S, Gualdron R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 1997; 26: 15-19.
- [21] Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica orgánica. Caracas (Venezuela): Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela; 2002. 588.
- [22] Contreras-Moreno B, Díaz L, Celis MT, Rojas J, Méndez L, Rosenzweig LP, Ontiveros J. Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira-Venezuela. Ciencia e Ingeniería. 2017; 38(3): 223-230.
- [23] Plaza CM, Díaz de Torres L, Lücking RK, Vizcaya M, Medina GE. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. J. Pharm. Pharmacogn. Res. 2014; 2(5): 138-147.
- [24] Díaz L, De Monjito S, Medina A, Meléndez P, Laurence V, Marti-Mestres G. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acné inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast, Rev. Per. Biol. 2011; 18(2), 153-158.
- [25] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) for estimating antioxidant activity, J. Sci. Technol. 2004; 26(2): 211-219.
- [26] Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot M. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds, J. Sci. Food Agric. 1999; 79(12): 1625-1634.
- [27] Plaza C. Identificación y estudio de actividades biológicas de nueve especies de líquenes, colectadas en el estado Mérida, Venezuela [tesis de doctorado]. Mérida. Universidad de Los Andes; 2015.
- [28] Sánchez L, Neira A. Bioensayo general de Letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense*. Cultura Científica. 2005; 3: 39-45.
- [29] Hernández, M. Actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L. [tesis de pregrado]. Lima. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
- [30] Waterman P, Mole S. Method in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites. Boston, United State: Blackwell Sci. 1994.
- [31] Valares, C. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. [Tesis de doctorado]. Badajoz. España. Universidad de Extremadura; 2011
- [32] Cabrera J, Jaramillo C, Dután F, Cun J, García P, Rojas L. Variacion del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleífera* Lam., en función de la edad y altura. Bioagro. 2017; 29 (1): 53-60.
- [33] Olivares TML, Dekker M, Verkerk R, Boekel M. Health-promoting compounds in cape gooseberry (*Physalis peruviana*). Trends in Food Science and Technology. 2016. 83-92. doi. 10.1016/j.tifs.2016.09.009.
- [34] Castañeda C, Ramos LI, Ibañez V. Evaluacion de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horizonte Médico. 2008; 8(1): 56-72
- [35] Arranz S. Compuestos fenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. [Tesis de Doctorado]. Madrid.

- España. Universidad Complutense de Madrid, 2010.
- [36] Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos Vol. I. Bogotá. (Colombia): Conveniko Andres Bello y CYTED; 2000.
- [37] Barrientos L, Lourdes M, Salcedo E, Villanueva S, Vargas J, Barradas B, Ruiz M. Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* Lam. silvestre y cultivo. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 2018; 10(51), 183-200
- [38] Santacoloma VLE, Granados MJE. Secondary Fitometabolites that affect the nutritional value of *Lotus corniculatus* as forage for ruminant animals/Fitometabolites secundarios que inciden en el valor nutricional de *Lotus corniculatus* como forraje para ruminantes/Lado Fitometabolites afetar o valor nutricional de *Lotus corniculatus* como forragem para ruminantes. Revista de Investigacion Agraria y Ambiental. 2014; 5(1): 131.
- [39] Bun SS, Laget M, Chae A, Bun H, Oliver E, Elias R. Cytotoxic Activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*, *In Vitro* cytotoxic activity of cepharanthine. Phytotherapy Research. 2009; 23(4): 587-590. doi: 10.1002/ptr.2617.
- [40] Zhao W, Qin G, Lou G. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. Journal of Asian Natural Product Research. 1999; 1(4): 307-311. doi: 10.1080/10286029908039879.
- Carlos Contreras**, Licenciado en Bioanálisis (2020). Egresado de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida Venezuela. **ORCID**. 0000-0001-5366-7536
- Tomás Visbal**. Farmacéutico (1992). Egresado de la Universidad de Los Andes. Magister Scientiae en Química de Medicamentos (2000), Doctor en Química de Medicamentos opción Productos Naturales (2014). Profesor categoría agregado a dedicación exclusiva del Departamento Ciencia de Los Alimentos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA. Mérida, Venezuela. **ORCID**. 0000-0003-1644-2228
- Marielba Morillo**. Farmacéutico (1995). Egresada de la Universidad de Los Andes, Magister Scientiae en Química de Medicamentos opción Productos Naturales (1999), Doctora en Ciencias Médicas Fundamentales (2014). Profesora categoría agregado a dedicación exclusiva del Departamento Ciencia de Los Alimentos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA. Mérida, Venezuela. **ORCID**. 0000-0002-6048-0590

Artículo original

# Distribución del contenido de cadmio en los diferentes componentes de cigarrillos comercializados en Venezuela después de fumados.

Distribution of cadmium content in the different components of cigarettes marketed in Venezuela after smoking.

Guillén Juan Carlos<sup>1\*</sup>, Petit de Peña Yaneira<sup>2</sup>, Vicuña-Fernández Nelson<sup>3</sup>, Briceno Luisa Carolina<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Escuela de Farmacia, Departamento de Análisis y Control. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Espectroscopia Molecular. <sup>3</sup>Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología y Toxicología. Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido: septiembre de 2022-Aceptado: noviembre de 2022

## RESUMEN

En este trabajo se efectuó caracterización del contenido de cadmio (Cd) en cenizas, filtros y humo total de 24 muestras de cigarrillos de diferentes marcas comercializadas en la ciudad de Mérida-Venezuela. Para ello, se diseñó y desarrolló una máquina fumadora que permite simular de algún modo el comportamiento de los fumadores con el objetivo de establecer un modelo de la tasa de transferencia de este metal al humo y su retención en cenizas y filtros, después de fumados bajo las condiciones estándares de fumada utilizando los métodos ISO/FTC 3308:2000(E), Intensivo Canadiense (IC) y Humano. La concentración de Cd obtenida en las muestras de ceniza y filtros para cada marca y método de fumado, varió en un rango de concentraciones de 0,09-1,49 µg/g y 0,002-0,024 µg/filtro respectivamente, observándose que el método IC se ajusta un poco más al comportamiento de un fumador humano que el método ISO/FTC. En este estudio se encontró evidencia experimental que la tasa de transferencia del Cd puede deberse a su volatilidad y reactividad, de modo que la cantidad secuestrada en la ceniza es de 10-30% del

contenido total en el cigarrillo, mientras que la retención en los filtros con carbón activado fue entre un 0,5-3%, movilizándose alrededor de un 70-90% directamente al humo principal y/o lateral, aumentando la exposición en los fumadores y los fumadores pasivos.

## PALABRAS CLAVES

Cadmio, tabaco, cigarrillo, cenizas, filtros, maquina fumadora.

## ABSTRACT

The characterization of cadmium (Cd) content in ashes, filters and total smoke of 24 samples of cigarettes with different brands marketed in the city of Merida-Venezuela was carried out. For this purpose, a smoking machine was designed and developed to simulate in some way the behavior of smokers, with the objective of establishing a model of the rate of transfer of this metal to the smoke and its retention in ashes and filters, after smoking under standard smoking conditions using the ISO/FTC 3308:2000(E), Canadian Intensive (IC), and human methods. The Cd concentration

obtained in the ash and filter samples for each brand and smoking method varied over a range of concentrations from 0.09-1.49  $\mu\text{g/g}$  and 0.002-0.025  $\mu\text{g/filter}$  respectively, noting that the **IC** method adjust a little more to the behavior of a human smoker than the **ISO/FACT** method. In this study, experimental evidence was found that the transfer rate of **Cd** may be due to its volatility and reactivity, so that the amount of ash sequestered is 10-30% of the total content in the cigarette, while the retention in the activated carbon filters was between 0.5-3%, mobilizing about 70-90% directly to the main or side smoke, increasing the exposure not only to smokers but also to passive smokers.

## KEY WORDS

Cadmium, tobacco, cigarette, ash, filter, machine-smoking.

## INTRODUCCIÓN

El cadmio (**Cd**) es un metal pesado tóxico relacionado con el cáncer de pulmón, próstata, páncreas y riñón, por tal razón, ha sido clasificado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y el Programa Nacional de Toxicología de los EE. UU como carcinógeno de categoría 1 [1-3]. Asimismo, este metal se ha asociado al desarrollo de importantes patologías como insuficiencia renal y hepática [4,5], alteraciones en el desarrollo neurológico [6], enfermedades cardiovasculares [7-10] y respiratorias [11-13].

En ausencia de exposición ocupacional específica, las principales fuentes de captación de **Cd** son los alimentos y el cigarrillo [14-16]. Se ha sabido, desde hace algunas décadas que el humo de cigarrillo proveniente de la combustión del tabaco, tiene el potencial de generar cantidades peligrosas de metales pesados [17]. La presencia de estos metales en el cigarrillo, se debe a la capacidad de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) de acumular cantidades relativamente altas de metales pesados de su entorno de crecimiento, acumulándose principalmente en sus partes aéreas [3,17,18], esta planta posee una capacidad

específica e inusualmente alta, de absorber el **Cd** del suelo y de acumularlo en las raíces y las hojas [19,20].

Debido a la exposición al **Cd** junto con el plomo, arsénico y níquel en fumadores y fumadores pasivos, el comité de expertos de regulaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), seleccionó estos metales como tóxicos prioritarios que deben ser reportados en los informes sobre los constituyentes del humo del cigarrillo [3, 21, 22]. Además, el **Cd** ha sido incluido en diferentes listas de priorización de los constituyentes del tabaco que deben ser reportados según las regulaciones de países como Estados Unidos y Canadá [23,24].

En los últimos 30 años el contenido de **Cd** en las diferentes marcas de cigarrillos producidos a nivel mundial, ha sido objeto de estudio por diversos investigadores, estimando que el contenido promedio de este metal se encuentra en el orden de  $1,72 \pm 0,81 \mu\text{g/g}$  de masa seca (**MS**) para un rango entre 0,10-6,10  $\mu\text{g/g MS}$  [14,25]. En Venezuela son muy pocos los estudios reportados, Petit y cols. en 2014 [14], estimaron que el contenido de **Cd** en las principales marcas de cigarrillos comercializados en Venezuela osciló entre 0,34-2,12  $\mu\text{g/g MS}$  para un promedio ( $n=17$ ) de  $0,91 \pm 0,52 \mu\text{g/g MS}$ .

Por esta razón, desde el punto de vista toxicológico, es de gran importancia establecer la cantidad de **Cd** que un fumador inhala directamente del humo principal hacia los pulmones y la cantidad que inhala los fumadores pasivos en el humo lateral. La entrega de **Cd** al humo de los cigarrillos durante su combustión, puede abordarse como una combinación de varios factores que incluyen la cantidad de este elemento presente en el tabaco, la tasa de transferencia que se ve afectada por el diseño del cigarrillo y las diferentes especies químicas que forme con los componentes presentes en la fase gaseosa del humo durante la combustión del tabaco [16].

En los diferentes estudios han estimado que alrededor del 15-30% del **Cd** contenido en el cigarrillo queda en las cenizas [8,26-32], otra porción entre 1,6-20% queda retenido por el filtro del cigarrillo [8,16,28,30-36] y aproximadamente 40-70% pasa al humo [8,16,26-28,30,31,33].

La distribución en el humo principal puede variar entre el 4,4-13,6% [37-41] y en el humo lateral entre 26,1-57,8% [38,39,41].

Para establecer la distribución de los componentes químicos presentes en los cigarrillos generados durante su combustión, se han desarrollado máquinas fumadoras que intentan de algún modo simular el comportamiento fumador de los seres humanos, con el propósito de determinar el contenido de alquitrán, nicotina y monóxido de carbono en el humo del cigarrillo cuando estos se fuman bajo condiciones estándares definidas, para así obtener parámetros analíticos característicos para cada marca comercializada [42]. Dentro de estas condiciones estándar de fumada para el análisis de rutina de los cigarrillos utilizando las máquinas fumadoras, se encuentra la descrita por la Organización Internacional de Normalización (ISO), en su método estándar ISO 3308:2000(E) [43]. Sin embargo, este método estándar no representa la conducta real de fumar de los seres humanos, ya que los fumadores son capaces de variar su ingesta de humo sobre una amplia gama de ajuste de diversos parámetros a sus necesidades personales [42]. De hecho, el comité científico de asesoramiento científico de la OMS en su convenio marco para el control del tabaco, recomiendan que el método ISO/FTC para las pruebas con cigarrillos adolecen de graves deficiencias; es por ello, que recomiendan estar suplementado con protocolos de inhalación más intensivos, que se adapten a las conductas reales de los fumadores, tales como los métodos estándar conocidos como Massachusetts e Intensivo Canadiense (IC) [44].

Para evaluar la emisión de metales durante la combustión del cigarrillo, se han diseñado un sin número de máquinas fumadoras específicas que incorporan una cámara de fumada, una boquilla para sostener el filtro, una bandeja para recolectar las cenizas y sistemas para la recolección de partículas provenientes del humo. Varios de estos diseños sencillos han sido reportados en la bibliografía para el análisis de metales en cigarrillos durante y después de su combustión [30,31,39,45-47], fumados bajo los métodos estándares de fumada.

En este sentido, en el presente trabajo se desarrolló una metodología analítica que involucra el diseño de una máquina fumadora para la

caracterización del contenido de Cd en cenizas, filtro y humo total de cigarrillos comercializados en Mérida-Venezuela, con el objetivo de establecer un modelo de la tasa de transferencia de este metal al humo y su retención en cenizas y filtros, después de fumados bajo las condiciones de fumada establecidas por los métodos ISO/FTC e IC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material de laboratorio:** Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua de 18 M $\Omega$ /cm a 25°C se obtuvo de un sistema purificador de agua, Barnstead, Nanopure Infinity® UV (Iowa, EE. UU). La solución patrón de 1000 mg/L de Cd se preparó disolviendo 1,0000 g del metal (99,99% de pureza, Merck, Alemania) en un volumen de ácido nítrico concentrado (J.T. Baker, Holanda, 65% m/m) y diluido a 1 L con ácido nítrico al 1% v/v. Las soluciones estándar de trabajo entre 0,5-8  $\mu$ g/L, fueron preparadas diariamente, ajustadas a un pH de 2,0 con ácido nítrico. Como agente quelante se utilizó una solución acuosa de pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC, Sigma Chemicals, Alemania, 99% m/m) al 0,20% m/v y como solvente de elución se utilizó metilisobutil cetona (MIBK, J.T. Baker, Holanda, 99% v/v). Para el tratamiento de las muestras se utilizó ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (Riedel-de Haën, Alemania, 30-34% v/v).

**Instrumentación:** Para la cuantificación de Cd se utilizó un espectrómetro de absorción atómica marca Varian Spectra 110, equipado con un sistema de bola de impacto en el nebulizador y una lámpara de cátodo hueco de Cd marca Varian; la longitud de onda y la corriente de lámpara usadas fueron 228,8 nm y 4 mA, respectivamente y el flujo de acetileno/aire de 1,0/5,0 L/min.

Para el funcionamiento de la máquina fumadora se utilizó una bomba de vacío marca Welch® (Thomas Industries INC, Skokie, EE. UU), una bomba de aire marca Shiruba® (Power Aquarium Enterprise Co, Taichung, China), un temporizador GraLab900 (Ohio, EE. UU), un flujómetro de aire (Platon NG Series, Reino Unido) y tuberías de politetrafluoroetileno.

Finalmente, para el tratamiento de las muestras se empleó un microondas Astronic (Chicago,

EE. UU), un baño ultrasónico Branson 1210 (Danbury, EE. UU), una bomba peristáltica Gilson Minipuls-3 (Ohio, EE. UU), un temporizador GraLab900 (Ohio, EE. UU) y tuberías de cloruro de polivinilo y politetrafluoroetileno.

**Metodología analítica para la cuantificación de cadmio:** Para la cuantificación del metal se utilizó una configuración de inyección de flujo con un sistema de preconcentración en columna, acoplado a un espectrómetro de absorción atómica con llama como sistema de detección (FI-FAAS), desarrollada y optimizada por Petit y cols. en 2014 [14].

**Muestras reales.** Se utilizaron 24 marcas de cigarrillos de diferentes precios, adquiridos en la ciudad de Mérida-Venezuela. Las mismas fueron separadas en dos grupos: en el primer grupo se encuentran las marcas comercializadas legalmente (M1-M13) y el segundo grupo correspondiente a las marcas comercializadas ilegalmente o contrabando de otros países (M14-M24).

Para este estudio se utilizaron cuarenta (40) cigarrillos (dos cajetillas) por marca, para un total de 850 cigarrillos analizados antes y después de fumados, los mismos fueron separados en tres grupos bajo el siguiente protocolo:

- ✓ Un grupo de 10 cigarrillos por marca (240 cigarrillos), fue destinado para el análisis del contenido total de **Cd** presente en el tabaco.
- ✓ Otro grupo de 20 cigarrillos por marca (480 cigarrillos), fue utilizado para el análisis de la ceniza y filtros después de fumados por la máquina fumadora, ajustada a las condiciones descritas por el Método **ISO/FT C3308:2000(E)** y el Método **IC**, descritos en la Tabla 1.
- ✓ Finalmente un grupo de 10 cigarrillos de solo las marcas (130 cigarrillos) comercializadas legalmente en el país (M1-M13), fueron fumadas por dos (02) fumadores humanos voluntarios, los cuales fumaron cada uno cinco (05) cigarrillos de cada marca, bajo las condiciones normales de consumo.

**TABLA 1.**  
Condiciones estándar de las máquinas fumadoras [42]

Método	Volumen de inhalación (mL)	Duración de la aspiración (s)	Intervalo de aspiración (s)	Boquilla de soporte del filtro (mm)	Orificios de ventilación (%)	Flujo de aire en la cámara (mL/s)
ISO/FTC	35 ± 0,3	2 ± 0,02	60 ± 0,5	9,0 ± 0,5	100	17,5
Canadiense "Método Intensivo"	55 ± 0,3	2 ± 0,02	30 ± 0,5	Cubre todo el filtro	0	10,5

**Máquina fumadora:** Se diseñó en el laboratorio una máquina fumadora analítica (Fig. 1) para el fumado de los cigarrillos bajo estudio, la misma permite simular de algún modo el comportamiento de los fumadores humanos. Para su desarrollo se sustentó en algunas modelos de máquinas reportados previamente en la bibliografía para el análisis de metales durante y después de fumado un cigarrillo [44,65]. Tal como se muestra en la Fig. 1, la máquina fumadora consta de varias partes:

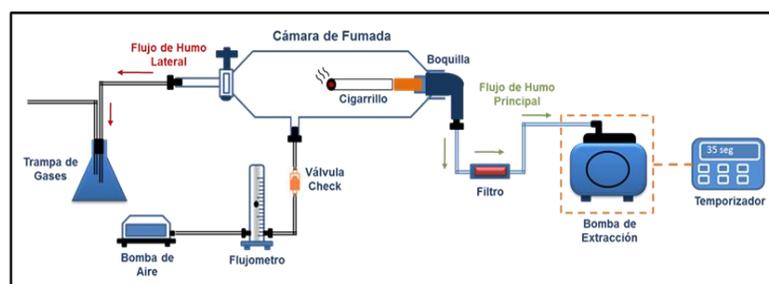
- 1) Una cámara de fumada de forma cilíndrica hecha de vidrio de borosilicato, la misma fue diseñada en el laboratorio y elaborada en el taller de soplado de vidrio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes; Mérida - Venezuela. Dicha cámara posee 10 cm de largo y 5 cm de diámetro, en uno de sus

extremos tiene una conexión esmerilada en donde se acopla la boquilla que sostiene el cigarrillo durante el proceso de combustión, en el otro extremo más estrecho cuenta con una salida que posee una llave esmerilada hacia la trampa de gases y en el centro tiene una entrada que permite la conexión de una bomba neumática de aire.

- 2) Una boquilla impermeable al humo elaborada de vidrio esmerilado, en uno de sus extremos se conecta a la bomba de succión y el otro extremo se acopla a un conector hecho de teflón que funciona como boquilla, donde se ajusta el cigarrillo desde el extremo trasero del filtro.
- 3) Una bomba de succión controlada por un temporizador, que permite la inhalación o puff

- del humo principal. Esta bomba se conecta a la boquilla mediante tuberías de teflón que poseen diámetros internos diferentes (1,2 y 1,5 mm), que permiten graduar el flujo de humo inhalado por la bomba de succión.
- 4) Un sistema de filtración compuesto por un filtro de fibra de vidrio que impide que el alquitrán generado durante la combustión del cigarrillo, tape las tuberías, contamine y deteriore la bomba de succión.

- 5) Una bomba neumática que incorpora un flujo de aire constante mediante un flujómetro a la cámara de fumada, simulando la corriente de aire normal en un ambiente abierto y un flujo de oxígeno adecuado para la combustión del cigarrillo, además se incorpora una válvula check que impide el retorno del humo.
- 6) Una trampa de humo o gases conectado a un sistema de vacío, que permite la extracción del humo lateral de la cámara de fumada, entre cada puff realizado.



**Fig. 1.** Máquina fumadora diseñada en el laboratorio para la combustión controlada de los cigarrillos, para la determinación de Cd presente en el cigarrillo.

Funcionamiento de la máquina: El funcionamiento de la máquina fumadora descrita en la Fig. 1, consta de dos etapas: **a)** primera etapa de succión o puff, se inicia por acción del temporizador que activa la bomba de vacío o succión por un tiempo de 2 s, para inhalar o succionar un volumen estandarizado de humo principal del cigarrillo. **b)** segunda etapa o período de espera por un tiempo preestablecido que simula el tiempo que un fumador espera entre inhalada e inhalada, en este tiempo la trampa de gases desaloja el humo secundario del cigarrillo de la cámara y simultáneamente una bomba neumática incorpora a la misma un volumen constante predeterminado de aire, para mantener las condiciones normales de la combustión, finalmente el temporizador vuelve a accionar la bomba de succión para comenzar de nuevo el ciclo hasta que se consuma completamente el cigarrillo.

Tratamiento y análisis de muestras: Para cada marca de cigarrillo en estudio, se estableció el número promedio de puff o inhalaciones necesarias para consumir completamente los cigarrillos. Para las muestras de filtros en estudio, se procedió inicialmente a obtener sus dimensiones (largo y

diámetro) y a clasificarlos según la presencia o ausencia de carbón activado (CA).

Tratamiento del tabaco: El tratamiento y análisis del contenido total de Cd presente en el tabaco de las muestras de cigarrillos descritas anteriormente, fueron previamente reportadas por Petit y cols. en 2014 [14].

Una vez fumados los cigarrillos, las muestras (cenizas y filtros) por marca y método usado, fueron recolectas por separado en contenedores cerrados y bolsas herméticas respectivamente, para ser almacenadas en desecadores y protegerlos de la humedad hasta su posterior análisis. El tratamiento de las muestras previo a la cuantificación del analito se llevó a cabo bajo el siguiente protocolo:

Tratamiento de las cenizas: Para garantizar la disolución completa del analito de interés, las cenizas fueron tratadas a través de una digestión ácida asistida con microondas, para ello, se pesó 0,5000 g de cada muestra, se trató usando una mezcla de  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  (4:2), una potencia de microondas de 210 W y un tiempo de digestión total de 8 min. Al completar la digestión, las muestras se diluyeron con agua 18 M $\Omega$ /cm hasta 50 mL, para finalmente ser filtradas con papel filtro Whatman 40 y eliminar los residuos remanentes.

**Tratamiento de los filtros:** Se diseñó un sistema de extracción continua del metal asistida con ultrasonido y una celda cerrada especial para contener la muestra (filtros) durante el proceso de extracción, sin que exista una destrucción total de la muestra. Dicho sistema consiste en un flujo cerrado proporcionado por una bomba peristáltica, que es accionada por un temporizador para controlar eficientemente los tiempos de extracción, permitiendo a la solución extractante pasar repetidamente durante el tiempo de extracción a través de la celda. Para ello, se utilizó el  $\text{HNO}_3$  como ácido extractante a una concentración de 0,01 y 0,40 mol/L para los filtros sin CA y con CA respectivamente, un flujo de extracción de 2 mL/min, un volumen de ácido extractante de 15 mL y un tiempo de extracción de 15 min.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Método analítico para la cuantificación de Cd:** Para cada una de las muestras bajo estudio fue determinada usando la configuración FI-FAAS, desarrollada y optimizada por Petit y cols. en 2014 [14].

**Análisis de muestras:** Inicialmente se procedió a obtener las dimensiones de los filtros y a clasificarlos según la presencia o ausencia de CA. Como se observa en la Tabla 2, en 17 de las 24 muestras en estudio se evidencia la presencia de CA granulado disperso dentro de la membrana de acetato de celulosa, de las cuales once (11) son muestras comercializadas legalmente en el país.

**TABLA 2.**

Comparación de las concentraciones ( $\mu\text{g Cd}$ / cigarrillo) y porcentaje de cadmio presente el tabaco, ceniza, filtros y su estimación en el humo para las diferentes marcas de cigarrillo y método de fumado usado.

Muestra	Presencia de carbón activado (CA)	Método	Contenido total de Cd en el cigarrillo ( $\mu\text{g Cd/cigarrillo} \pm \text{DE}$ )	Contenido de Cd en ceniza ( $\mu\text{g Cd/ceniza} \times \text{cigarrillo} \pm \text{DE}$ )	%Cd Ceniza	Contenido de Cd en Filtro ( $\mu\text{g Cd/filtro} \pm \text{DE}$ )	%Cd Filtro	*Contenido estimado en el humo del cigarrillo ( $\mu\text{g Cd/humo}$ )	%Cd estimado en el humo del cigarrillo
M1	Si	ISO	$0,867 \pm 0,034$	$0,171 \pm 0,009$	19,71	$0,0166 \pm 0,0007$	1,91	0,679	78,38
		IC		$0,153 \pm 0,009$	17,70	$0,0245 \pm 0,0013$	2,82	0,688	79,35
		Humano		$0,155 \pm 0,009$	17,82	$0,0211 \pm 0,0011$	2,43	0,691	79,74
M2	Si	ISO	$0,677 \pm 0,161$	$0,116 \pm 0,004$	17,07	$0,0125 \pm 0,0006$	1,85	0,549	81,08
		IC		$0,0345 \pm 0,0020$	5,10	$0,0171 \pm 0,0009$	2,53	0,623	92,08
		Humano		$0,0414 \pm 0,0025$	6,12	$0,0150 \pm 0,0008$	2,22	0,620	91,66
M3	Si	ISO	$0,571 \pm 0,014$	$0,112 \pm 0,004$	19,61	$0,0013 \pm 0,0001$	0,23	0,458	80,16
		IC		$0,0408 \pm 0,0014$	7,15	$0,0054 \pm 0,0004$	0,95	0,525	91,90
		Humano		$0,0444 \pm 0,0018$	7,78	$0,0063 \pm 0,0003$	1,10	0,520	91,12
M4	No	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
		IC							
		Humano							
M5	Si	ISO	$1,097 \pm 0,118$	$0,250 \pm 0,004$	22,81	$0,0075 \pm 0,0003$	0,68	0,839	76,50
		IC		$0,131 \pm 0,008$	11,96	$0,0261 \pm 0,0014$	2,38	0,939	85,66
		Humano		$0,145 \pm 0,006$	13,18	$0,0179 \pm 0,0010$	1,63	0,934	85,18

\*Contenido estimado de Cd en el humo del cigarrillo (principal y/o lateral) obtenido:  $\mu\text{g Cd Humo} = \mu\text{Cd Total} - (\mu\text{Cd ceniza} + \mu\text{Cd filtro})$  [8,28].  
 ND: no detectable. SF: sin filtro. (-): No calculado.

TABLA 2.

Comparación de las concentraciones ( $\mu\text{g Cd}$ / cigarrillo) y porcentaje de cadmio presente el tabaco, ceniza, filtros y su estimación en el humo para las diferentes marcas de cigarrillo y método de fumado usado. (Continuación)

Muestra	Presencia de carbón activado (CA)	Método	Contenido total de Cd en el cigarrillo ( $\mu\text{g Cd/cigarrillo} \pm \text{DE}$ )	Contenido de Cd en ceniza ( $\mu\text{g Cd/ceniza} \times \text{cigarrillo} \pm \text{DE}$ )	%Cd Ceniza	Contenido de Cd en Filtro ( $\mu\text{g Cd/filtro} \pm \text{DE}$ )	%Cd Filtro	*Contenido estimado en el humo del cigarrillo ( $\mu\text{g Cd/humo}$ )	%Cd estimado en el humo del cigarrillo
M6	Si	ISO	0,563 $\pm$ 0,026	0,0675 $\pm$ 0,0032	12,00 4,58 6,50	0,0025 $\pm$ 0,0008	0,44	0,493	87,56
		IC		0,0258 $\pm$ 0,0011		0,0157 $\pm$ 0,0009	2,79	0,521	92,63
		Humano		0,0366 $\pm$ 0,0010		0,0069 $\pm$ 0,0003	1,23	0,519	92,27
M7	Si	ISO	1,049 $\pm$ 0,254	0,183 $\pm$ 0,003	17,48	0,0081 $\pm$ 0,0005	0,77	0,858	81,48
		IC		0,0913 $\pm$ 0,0035	8,70	0,0142 $\pm$ 0,0006	1,35	0,950	89,94
		Humano		0,0801 $\pm$ 0,0034	7,72	0,0111 $\pm$ 0,0004	1,06	0,958	91,31
M8	Si	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
		IC							
		Humano							
M9	Si	ISO	0,276 $\pm$ 0,068	0,0384 $\pm$ 0,0016	13,89	0,0034 $\pm$ 0,0006	1,23	0,225	81,26
		IC		0,0220 $\pm$ 0,0014	7,96	0,0062 $\pm$ 0,0003	2,24	0,248	89,80
		Humano		0,0294 $\pm$ 0,0013	10,64	0,0054 $\pm$ 0,0009	1,95	0,262	87,41
M10	Si	ISO	0,334 $\pm$ 0,027	0,0410 $\pm$ 0,0018	12,27	0,0055 $\pm$ 0,0009	1,64	0,288	86,09
		IC		0,0200 $\pm$ 0,0012	5,98	0,0064 $\pm$ 0,0009	1,92	0,308	92,10
		Humano		0,0211 $\pm$ 0,0011	6,31	0,0058 $\pm$ 0,0010	1,74	0,307	91,95
M11	Si	ISO	0,215 $\pm$ 0,058	0,0575 $\pm$ 0,0021	26,74	0,0024 $\pm$ 0,0001	1,12	0,155	72,14
		IC		0,0243 $\pm$ 0,0007	11,30	0,0048 $\pm$ 0,0003	2,23	0,186	85,04
		Humano		0,0218 $\pm$ 0,0010	10,14	0,0049 $\pm$ 0,0003	2,28	0,189	88,05
M12	No	ISO	0,219 $\pm$ 0,043	0,0511 $\pm$ 0,0020	23,37	ND	-	0,168	76,62
		IC		0,0255 $\pm$ 0,0009	11,66			0,193	88,33
		Humano		0,0200 $\pm$ 0,0004	9,15			0,199	90,85
M13	No	ISO	0,235 $\pm$ 0,039	0,0192 $\pm$ 0,0008	8,17	ND	-	0,216	91,83
		IC		0,0107 $\pm$ 0,0009	4,55			0,224	95,45
		Humano		0,0165 $\pm$ 0,0005	7,02			0,219	92,98
M14	No	ISO	0,358 $\pm$ 0,029	0,0212 $\pm$ 0,0008	5,92	ND	-	0,337	94,08
		IC		0,0161 $\pm$ 0,0009	4,49			0,342	95,51
M15	No	ISO	0,439 $\pm$ 0,038	0,0591 $\pm$ 0,0013	13,46	ND	-	0,380	86,54
		IC		0,0403 $\pm$ 0,0012	9,18			0,399	90,82

\*Contenido estimado de Cd en el humo del cigarrillo (principal y/o lateral) obtenido:  $\mu\text{g Cd Humo} = \mu\text{Cd Total} - (\mu\text{Cd ceniza} + \mu\text{Cd filtro})$  [8,28].

ND: no detectable. SF: sin filtro. (-): No calculado.

TABLA 2.

Comparación de las concentraciones ( $\mu\text{g Cd}$ / cigarrillo) y porcentaje de cadmio presente el tabaco, ceniza, filtros y su estimación en el humo para las diferentes marcas de cigarrillo y método de fumado usado. (Continuación)

Muestra	Presencia de carbón activado (CA)	Método	Contenido total de Cd en el cigarrillo ( $\mu\text{g Cd/cigarrillo} \pm \text{DE}$ )	Contenido de Cd en ceniza ( $\mu\text{g Cd/ceniza} \times \text{cigarrillo} \pm \text{DE}$ )	%Cd Ceniza	Contenido de Cd en Filtro ( $\mu\text{g Cd/filtro} \pm \text{DE}$ )	%Cd Filtro	*Contenido estimado en el humo del cigarrillo ( $\mu\text{g Cd/humo}$ )	%Cd estimado en el humo del cigarrillo
M16	SF	ISO	$0,832 \pm 0,124$	$0,224 \pm 0,003$	26,89	SF	-	0,608	73,11
		IC		$0,118 \pm 0,004$	14,22			0,714	85,78
M17	No	ISO	$0,408 \pm 0,010$	$0,0782 \pm 0,0014$	19,18	ND	-	0,330	80,82
		IC		$0,0357 \pm 0,0012$	8,75			0,372	91,24
M18	Si	ISO	$0,440 \pm 0,079$	$0,0362 \pm 0,0011$	8,23	$0,0016 \pm 0,0004$	0,36	0,402	91,41
		IC		$0,0307 \pm 0,0010$	6,98	$0,0046 \pm 0,0005$	1,05	0,405	91,98
M19	Si	ISO	$0,484 \pm 0,011$	$0,103 \pm 0,001$	21,23	$0,0073 \pm 0,0003$	1,51	0,374	77,27
		IC		$0,0620 \pm 0,0013$	12,80	$0,0080 \pm 0,0004$	1,65	0,414	85,55
M20	Si	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
	IC								
M21	Si	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
		IC							
M22	Si	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
		IC							
M23	Si	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
		IC							
M24	Si	ISO	ND	ND	-	ND	-	-	-
		IC							

\*Contenido estimado de Cd en el humo del cigarrillo (principal y/o lateral) obtenido:  $\mu\text{g Cd Humo} = \mu\text{Cd Total} - (\mu\text{Cd ceniza} + \mu\text{Cd filtro})$  [8,28].  
 ND: no detectable. SF: sin filtro. (-): No calculado.

La masa promedio obtenida de los cigarrillos (tabaco, papel y filtro) fue de  $0,88 \pm 0,05$  g, con un contenido medio de tabaco de  $0,66 \pm 0,07$  g, para una longitud promedio de los cigarrillos de  $73,8 \pm 6,3$  mm.

La cantidad promedio de ceniza producida durante la combustión de cada cigarrillo fue de  $0,12 \pm 0,02$  g, lo que nos indica que la masa de ceniza originada durante la combustión representa una media de  $17,81 \pm 0,98\%$  del peso total de tabaco o el  $13,34 \pm 0,97\%$  del peso total de los cigarrillos.

**Concentración de Cd en las muestras de tabaco de los cigarrillos:** La concentración de Cd obtenida en las muestras de tabaco de las diferentes marcas de cigarrillos descrita en la Tabla 2, fue previamente reportada por Petit y cols. en 2014 [28]. Obteniendo que la media (n=17) de Cd en las marcas de cigarrillos estudiadas fue de  $0,91 \pm 0,52$

$\mu\text{g/g}$  de masa seca (MS) (para un rango  $0,34 - 2,12$   $\mu\text{g/g}$ ) o de  $0,55 \pm 0,33$   $\mu\text{g/cigarrillo}$  (para un rango  $0,21-1,29$   $\mu\text{g/cigarrillo}$ ). Para las muestras (M4, M8 y M20-M24), las concentraciones de Cd se encontraron por debajo del límite de detección (LD) de la metodología analítica utilizada.

**Concentración de Cd en las muestras de ceniza:** La concentración de Cd obtenida en las muestras de ceniza para cada marca y método de fumado utilizado se presentan en la Tabla 2, observándose que las concentraciones del analito en las muestras con niveles detectables de Cd (n=17), varían en un rango entre  $0,09-1,49$   $\mu\text{g/g}$  de ceniza o de  $0,01-0,25$   $\mu\text{g}$  de Cd / ceniza producida por cigarrillo, encontrándose (ver Fig. 2A) que las muestras M1, M5, M7, M16 y M19 son las que poseen mayor concentración de Cd en sus cenizas, seguidas por  $M2 > M3 > M17 > M6$  y el resto de

las muestras las concentraciones fueron más bajas, en aquellas marcas en donde no se obtuvo niveles detectables de **Cd** en el tabaco (M4, M8, M20-M24), tampoco se lograron niveles detectables de **Cd** en ceniza.

Si comparamos el porcentaje promedio de **Cd** presente en las cenizas por los tres métodos de fumada, encontramos que el mayor porcentaje se obtuvo durante la combustión bajo el método **ISO/FTC** ( $17,46 \pm 6,38\%$ ), seguido por los métodos **IC** ( $8,42 \pm 3,08\%$ ) y humanos ( $8,40 \pm 2,18\%$ ). Al comparar el contenido de **Cd** para todas las muestras de ceniza obtenidas bajo el método **IC** con el método **ISO/FTC**, observamos que las muestras bajo el método **IC** fueron alrededor de  $42,96 \pm 12,80\%$  inferiores a las obtenidas por el método **ISO/FTC**, al contrastar estadísticamente los porcentajes medios de **Cd** en las cenizas obtenidas después de fumar los cigarrillos por los dos métodos, se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias obtenidas en ambos métodos, lo que nos podría indicar que al aumentar la frecuencia en las inhalaciones y el volumen de humo inhalado, mayor cantidad **Cd** pasa al humo principal, disminuyendo así, la cantidad del metal que queda en las cenizas del cigarrillo después de fumado; el mismo escenario se presentó al establecer la diferencia entre el método de fumado **ISO/FTC** y humano.

Las concentraciones de **Cd** en las muestras de cenizas obtenidas después de ser fumadas por humanos (M1-M13), variaron en un rango entre 0,02-0,15  $\mu\text{g}$  de **Cd**/ceniza por cigarrillo, al compararlas con las concentraciones obtenidas en el método **IC**, se encontró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre estos dos regímenes de fumado, lo que nos podría indicar que el método **IC** se ajusta un poco más al comportamiento de un fumador humano, fortaleciendo entonces la teoría del comité científico de la OMS, donde un protocolo de inhalación más intensivo que el método oficial **ISO/FTC**, proporcionan un nivel más aproximado de exposición al que normalmente puede estar sujeto un fumador ordinario [44].

**Concentración de Cd en las muestras de filtros:** La concentración de **Cd** obtenida en las muestras de filtros después de fumados para cada

marca y método usado se presentan en la Tabla 2, observándose que las concentraciones del analito varían en un rango entre 0,002-0,024  $\mu\text{g}$ /filtro. Las mayores cantidades retenidas en los filtros, se obtuvieron en las marcas de cigarrillos M1, M2, M5, M6 y M7, con concentraciones que variaron entre 0,014-0,026  $\mu\text{g}$ /filtro.

Estos resultados evidencian que la cantidad de **Cd** retenido en los filtros es proporcional al contenido total de **Cd** presente en el tabaco para cada marca de cigarrillos estudiada, por lo tanto, a mayor contenido de **Cd** en el tabaco mayor es la cantidad del metal que es retenido en el filtro, sin observarse algún proceso de saturación en el filtro, lo que no implica que todo el **Cd** que transita con el humo principal a través del filtro sea retenido por el mismo. Para aquellas marcas en donde no se obtuvo niveles detectables de **Cd** en el tabaco (M4, M8, M20-M24), tampoco se lograron niveles detectables de **Cd** en sus filtros.

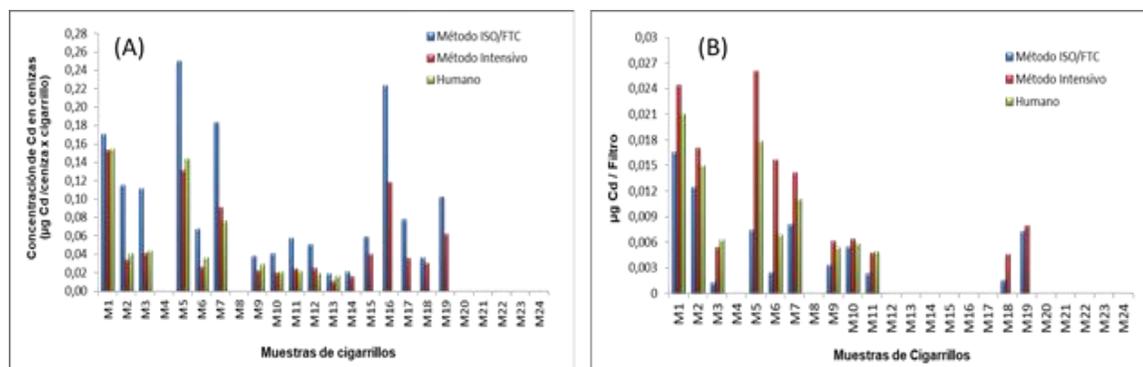
Además, se puede observar que para las muestras de filtros sin **CA** antes y después de ser fumados (M12-M15 y M17), los niveles de **Cd** se encuentran por debajo del **LD** de la metodología utilizada, sin embargo, los filtros con **CA** para las marcas con niveles detectables de **Cd** en el tabaco (M1-M11, M18 y M19), se observó la presencia del metal, lo que evidencia que el **CA** en los filtros aumenta la retención del analito y por ende disminuye la cantidad de este que es aspirado por el fumador.

La mayor distribución en el contenido de **Cd** en todas las muestras de filtros se obtuvo durante la combustión bajo el método **IC**, tal como se muestra en la Fig. 2B. En este estudio se consiguió un efecto contrario al obtenido en las cenizas, es decir, los mayores niveles de **Cd** retenidos en el filtro se consiguieron en cigarrillos fumados bajo el método **IC** que los fumados bajo el método **ISO/FTC**, esto corrobora los resultados obtenidos en las cenizas, en donde al aumentar la frecuencia en las inhalaciones y el volumen de humo inhalado, mayor cantidad de **Cd** queda atrapado en el filtro, disminuyendo así, la cantidad del metal que queda en las cenizas del cigarrillo después de fumado.

Si comparamos el porcentaje promedio de **Cd** presente en los filtros obtenidos por los tres métodos de fumada, encontramos que el menor porcentaje se obtuvo durante la combustión bajo el

método **ISO/FTC** ( $1,07 \pm 0,61\%$ ), seguido por los humanos ( $1,74 \pm 0,52\%$ ) y el método **IC** ( $2,10 \pm 0,66\%$ ). Las concentraciones de **Cd** para todas las muestras de filtros obtenidas bajo el método **IC** y humano, fueron alrededor de  $47,30 \pm 21,12\%$  superiores a las obtenidas por el método **ISO/FTC**, una proporción similar a la obtenida en la disminución del contenido de **Cd** en las cenizas entre ambos métodos.

Lo que indica, que al aumentar la frecuencia y el volumen en las inhalaciones disminuye en alrededor de 43% el contenido de **Cd** en las cenizas y a su vez aumenta en alrededor de 47% el **Cd** que es retenido en los filtros, esta explicación solo podría ser aplicable para las muestras que en sus filtros contienen **CA**, disminuyendo así, la cantidad del metal que queda en las cenizas del cigarrillo.



**Fig. 2.** Representación gráfica del contenido de cadmio obtenido para las diferentes muestras de cenizas (A) y filtros (B) después de ser fumadas por los métodos **ISO/FTC**, Intensivo Canadiense y por humanos fumadores.

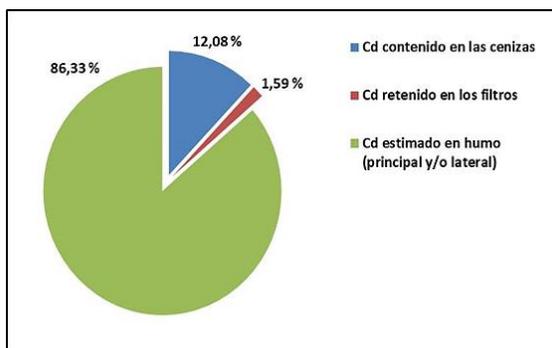
**Comparación entre las concentraciones de Cd encontradas en el tabaco, ceniza y filtros para cada marca de cigarrillo y método de fumado empleado:** Si contrastamos los niveles de **Cd** medios obtenidos en tabaco de cada muestra estudiada antes de ser fumados, con el contenido de este metal encontrado en las cenizas y filtros de las mismas muestras después de fumados por los diferentes métodos (**ISO/FTC**, **IC** y por humanos), tal como se muestran en la Fig. 3, encontramos que el porcentaje medio de **Cd** contenido para todas las marcas de cigarrillos en las cenizas fue de  $12,08 \pm 6,14\%$  y en los filtros fue de  $1,59 \pm 0,71\%$ , apoyados en el contenido total del metal presente en el tabaco del cigarrillo.

Basados en los datos obtenidos en las diferentes marcas estudiadas, se podría estimar el contenido total de **Cd** que pasa al humo principal y/o lateral, mediante la diferencia entre el contenido total de **Cd** obtenido en el tabaco para cada muestra estudiada y la sumatoria del metal presente en las cenizas y filtros después de fumados para cada método, según la ecuación propuesta por Afridi y cols. [8] y Kazi y cols. [28], tal como se muestra en la Tabla 2. Se puede estimar que el contenido promedio de **Cd** por cigarrillo que pasa al humo es

de  $0,46 \pm 0,13$  µg/cigarrillo para un rango de 0,16-0,98 µg/cigarrillo, lo que equivale a decir que alrededor del  $86,33 \pm 6,19\%$  del **Cd** contenido en los cigarrillos es transferido o movilizado directamente al humo principal y/o lateral (ver Fig. 3), aumentando la exposición no solo a los fumadores sino también a los fumadores pasivos. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en dos estudios independientes realizados por Kazi y cols. [28], Afridi y cols. [8] y Piadé y cols. [16] en marcas de cigarrillos provenientes de diversos países, encontraron que alrededor del 50-70% del **Cd** es movilizado hacia el humo total, lo que significa que los cigarrillos producidos en nuestro país pueden movilizar alrededor de 10-20% más de **Cd** al humo total, esta diferencia podría atribuirse al hecho que la retención de **Cd** en los filtros en estos dos estudios fue mayor y osciló entre un 15-20%, lo que supondría que los filtros de los cigarrillos en estos países son más eficientes en la retención de **Cd** posiblemente por la presencia de mayores cantidades de **CA**.

Si comparamos el promedio de **Cd** que es movilizado al humo por los tres métodos de fumada, encontramos que el porcentaje promedio obtenido bajo el método **ISO/FTC** ( $82,14 \pm 6,50\%$ )

presenta diferencias estadísticamente significativas con los métodos IC ( $89,60 \pm 4,18\%$ ) y humano ( $89,32 \pm 3,98\%$ )



**Fig. 3.** Representación gráfica de la distribución porcentual del contenido promedio de cadmio en sus diferentes componentes obtenido para las diversas marcas de cigarrillos después de ser fumadas por los distintos métodos de fumado.

La tasa de transferencia del **Cd** va a depender principalmente de las diferentes especies químicas que forme con los componentes presentes en la fase gaseosa del humo durante la combustión del tabaco y dichas especies dependen de las temperaturas que alcanzan durante la combustión del cigarrillo [16]. Este metal se presenta principalmente en el tabaco como parte de moléculas orgánicas y, por lo tanto, puede liberarse eficazmente de la biomasa en un 90% por encima de los 450 °C [16]. Liberándose en la fase gaseosa como **Cd(0)**, para luego sufrir reacciones oxidativas hasta **Cd(II)**, esta especie reactiva puede reaccionar fácilmente con los componentes presentes en la fase gaseosa del humo y radicales alquilo que se forman por descomposición del tabaco en la zona caliente, formando posiblemente compuestos como  $\text{CdO}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{CdCO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ ; las tres primeras especies son no volátiles y por ello, tienden a ser depositadas en las cenizas o en la fase de partículas del humo [16]. Bajo la forma de  $\text{CdCl}_2$  podría ser sublimado por encima de 300 °C, transfiriéndose a la corriente de humo lateral [48] formando parte de la ceniza volante [49] y bajo la forma de dimetilcadmio [ $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ ] que proviene de la reacción en la fase gaseosa con radicales hidrocarbonados por debajo de los 300 °C [50], este compuesto es muy volátil y reactivo, observándose como especies radicales importantes en el humo principal [51,52].

## CONCLUSIONES

En este estudio se encontró evidencia experimental que la tasa de transferencia del **Cd** puede deberse a su volatilidad y reactividad, de modo que la cantidad secuestrada en la ceniza no es más del 10-30%, mientras que la retención en los filtros con **CA** fue de tan solo entre un 0,5-3%, por tal razón, se estima que alrededor de un 70-90% puede movilizarse directamente al humo principal y/o lateral, aumentando la exposición no solo a los fumadores sino también a los fumadores pasivos. Estos datos nos indican que un fumador que consume un promedio de un paquete diario de cigarrillos (20 cigarrillos), alcanzaría inhalar entre 0,3-2  $\mu\text{g}$  **Cd**/día, dependiendo de la marca y el modo de fumado del individuo.

Se estableció que el contenido de **Cd** en las muestras de ceniza y filtros de cigarrillos después de fumados, varían en función del método de fumado usado (**ISO/FTC** o **IC**), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de **Cd** de las cenizas y filtros entre los dos métodos. Sin embargo, al comparar el contenido de **Cd** en las muestras de ceniza y filtros de las marcas de cigarrillos fumadas por humanos voluntarios y el método **IC**, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que nos podría indicar que el método **IC** se ajusta un poco más al comportamiento de un fumador humano que el método **ISO/FTC**.

Basados en el hecho, en que no existen datos suficientes sobre las concentraciones de metales pesados como el **Cd** en las marcas de cigarrillos comercializadas en Venezuela. Este estudio aporta nuevos datos para las autoridades de salud y de ambiente nacionales, además de otras autoridades de salud mundiales como la UNICEF y la OMS, para complementar los datos disponibles sobre la exposición al **Cd** debida al consumo de cigarrillo en Venezuela.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Grupo de trabajo de la IARC sobre la evaluación de los riesgos cancerígenos para los seres humanos. Berilio, cadmio, mercurio y exposiciones en la industria de fabricación de vidrio, 58<sup>th</sup>. Lyon (Francia): Agencia

- Internacional para la Investigación del Cáncer; [Página Web] 1993. [acceso: 5 octubre 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499756/>
- [2] Department of health and human services United States. Public health service. NTP 12th. Report on carcinogens. Rep Carcinog. (EE. UU); 2011; 12: p 80-83.
- [3] Campbell RCJ, Klerx WNM, Talhout R, Stephens WE. Speciation of metals and metalloids in tobacco and tobacco smoke: Implications for health and regulation. Holanda: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM letter report. Bilthoven (Netherlands); 2015. p 10-23.
- [4] Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 154(3): 256-263. doi: 10.1006/taap.1998.8586.
- [5] Li Y, Lim SC. Cadmium-induced apoptosis of hepatocytes is not associated with death receptor-related caspase-dependent pathways in the rat. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007; 24(3): 231-238. doi: 10.1016/j.etap.2007.05.010.
- [6] Ohtani-Kaneko R, Tazawa H, Yokosuka M, Yoshida M, Satoh M, Watanabe C. Suppressive effects of cadmium on neurons and affected proteins in cultured developing cortical cells. *Toxicology.* 2008; 253(1-3): 110-116. doi: 10.1016/j.tox.2008.08.021
- [7] Yoopan N, Watcharasit P, Wongsawatkul O, Piyachaturawat P, Satayavivad J. Attenuation of eNOS expression in cadmium-induced hypertensive rats. *Toxicol Lett.* 2008; 176(2): 157-161. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.11.002
- [8] Afridi H, Kazi T, Talpur F, Brabazon D, Naher S. Estimation of toxic elements in the samples of different cigarettes and their impact on human health of Irish hypertensive consumers. *Clin Chim Acta.* 2013; 426: 51-57. doi: 10.1016/j.cca.2013.08.023
- [9] Navas-Acien A, Selvin E, Sharrett AR, Calderon-Aranda E, Silbergeld E, Guallar E. Lead, cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. *Circulation.* 2004; 109(25): 3196-3201. doi: 10.1161/01.CIR.0000130848.18636.B2
- [10] Everett CJ, Frithsen IL. Association of urinary cadmium and myocardial infarction. *Environ Res.* 2008; 106(2): 284-286. doi: 10.1016/j.envres.2007.10.009
- [11] Kirschvink N, Vincke G, Fiévez L, Onclinx C, Wirth D, Belleflamme M, et al. Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats. *Toxicology.* 2005; 211(1-2): 36-48. doi: 10.1016/j.tox.2005.02.012
- [12] Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respir Care.* 2001; 46(8):798-825. doi: 10.1136/oem.2003.009282
- [13] Sorahan T, Esmen NA. Lung cancer mortality in UK nickel-cadmium battery workers, 1947-2000. *J Occup Environ Med.* 2004; 61(2): 108-116. doi: 10.1136/oem.2003.009282
- [14] Petit de Peña Y, Guillén JC, Vicuña-Fernández N, Briceño LC, Carrero P, Peñalosa H. Determinación del contenido de cadmio en muestras de tabaco de cigarrillos comercializados en Venezuela. *Rev Fac Farm.* 2014; 56(1): 26-39.
- [15] Lemos VA, Novaes CG, Lima Ada S, Vieira DR. Flow injection preconcentration system using a new functionalized resin for determination of cadmium and nickel in tobacco samples. *J Hazard Mater.* 2008; 155(1-2): 128-134. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.039
- [16] Piadéa JJ, Jaccardb G, Dolkaa C, Belushkina M, Wajrock S. Differences in cadmium transfer from tobacco to cigarette smoke, compared to arsenic or lead. *Toxicol Rep.* 2015; 2: 12-26. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.11.005
- [17] Stephens E, Calder A, Neton J. Source and health implications of high toxic metal

- concentrations in Illicit tobacco products. *Environ Sci Technol.* 2005; 39(2): 479-488. doi: 10.1021/es049038s
- [18] Pérez J, Castillo I, Paz D. Asimilación de cadmio y plomo por la *Nicotiana Tabacum* Variedad “Criollo 98” cultivada en un suelo contaminado artificialmente. Parte II: Acumulación de metales pesados Centro Agrícola. 2007; 34(3): 45-51.
- [19] Pavláková D, Macek T, Macková M, Száková J, Balíka J. Cadmium tolerance and accumulation in transgenic tobacco plants with a yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2004; 54(2-3): 233-237. doi: 10.1016/j.ibiod.2004.03.008
- [20] Angelova I, Ivanova R. Effect of chemical forms of lead, cadmium, and zinc in polluted soils on their uptake by tobacco. *J. Plant Nutr.* 2004; 27(5): 757-773. doi: 10.1081/PLN-120030609
- [21] World Health Organization (WHO). Evaluation of certain food additives and contaminants 41th. Technical reports Series, No.837. Ginebra (Suiza); 1993, p 28-30.
- [22] Ashley DL, Burns D, Djordjevic M, Dybing E, Gray N, Hammond SK, et al. WHO Study Group on Tobacco Product Regulation. The scientific basis of tobacco product regulation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2008; 951: 1-277.
- [23] Canadian Ministry of Justice. Health-Canada. Tobacco reporting regulations. Report on tobacco constituents SOR/2019-64, Part. 5. Ottawa (Canadian); 2022.
- [24] United States Department of health and human services. Food and Drug Administration (FDA). Harmful and potentially harmful constituents in tobacco products and tobacco smoke; Established list. Federal register 77, 20034-20037. (EE. UU); 2012.
- [25] Nnorom I, Osibanjo O, Oji-Nnorom CG. Cadmium determination in cigarettes available in Nigeria. *Afr J Biotechnol.* 2005; 4(10): 1128-1132. doi: 10.5897/AJB2005.000-3223.
- [26] Chiba M, Masironi R. Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bull World Health Organ.* 1992; 70(2): 269-275.
- [27] Pinto E, Cruz M, Ramos P, Santos A, Almeida A. Metals transfer from tobacco to cigarette smoke: Evidences insmokers' lung tissue. *J Hazard Mater.* 2017; 325: 31-35. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.069
- [28] Kazi T, Jalbani N, Arain M, Jamali MK, Afridi HI, Sarfraz RA, Shah AQ. Toxic metals distribution in different components of Pakistani and imported cigarettes by electrothermal atomic absorption spectrometer. *J Hazard Mater.* 2009; 163(1): 302-307. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.088
- [29] Kadioğlu B, Naltekin E, Charehsaz M, Sipahi H, Soykut B, Aydin A. The relationship between cadmium contents of tobacco and their ash in cigarettes marketed under different brands. *J Pharm Sci.* 2012; 37(3): 129-132.
- [30] Pelit FO, Demirdöğen RE, Henden E. Investigation of heavy metal content of Turkish tobacco leaves, cigarette butt, ash, and smoke. *Environ Monit Assess.* 2013; 185(11): 9471-9479. doi: 10.1007/s10661-013-3266-4
- [31] Ting Ren, Xi Chen, Ge Y, Zhao L, Zhong R. Determination of heavy metals in cigarettes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal Methods.* 2017; 9(27): 4033-4043. doi: 10.1039/C7AY00930E
- [32] Carrone G, Morzan E, Tudino M, Etchenique R. Determination of cadmium in commercial tobacco by EMFAAS. *J Anal At Spectrom.* 2018; 33(11): 1970-1973. doi: 10.1039/C8JA00195B
- [33] Sugita M, Izuno T, Tatemichi M, Otahara Y. Cadmium absorption from smoking cigarettes: calculation using recent findings from Japan. *Environ Health Prev Med.* 2001; 6(3): 154-159. doi: 10.1007/BF02897963
- [34] Moerman JW, Potts GE. Analysis of metals leached from smoked cigarette litter. *Tob Control.* 2011; 20(Suppl 1): i30-i35. doi: 10.1136/tc.2010.040196
- [35] Galażyn-Sidorczuk M, Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Estimation of Polish cigarettes contamination with cadmium and lead, and exposure to these metals via smoking

- Environ Monit Assess. 2008; 137(1-3): 481-493. doi: 10.1007/s10661-007-9783-2
- [36] Poorolajal J, Javad Assari M, Mohammadi Y, Gohari-Ensaf F. Impact of cigarettes' filter length and diameter on cigarette smoke emissions. *Clin Epidemiology Glob. Health.* 2020; 8(2): 377-382. doi: 10.1016/j.cegh.2019.09.006
- [37] Elinder C, Kjellström T, Lind B, Linnman L, Piscator M, Sundstedt K. Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ Res.* 1983; 32(1): 220-227. doi: 10.1016/0013-9351(83)90209-8
- [38] Szadkowski D, Schultze H, Schaller K, Lehnert G. Zur ökologischen Bedeutung des Schwermetallgehaltes von Zigaretten: Blei-Cadmium und Nickelanalysen Tabaks sowie der Gas- und Partikelphase. *Arch Hyg Bakteriol.* 1969; 153(1): 1-8.
- [39] Kalcher K, Kern W, Pietsch R. Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Sci Total Environ.* 1993; 128(1): 21-35. doi: 10.1016/0048-9697(93)90177-8
- [40] Schmidt J, Fischbach E, Burkart F. Cadmium studies on the effect of environment, soil and variety on tobacco can cadmium transfer into cigarette smoke. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1985; 180(4): 306-311. doi: 10.1007/BF01851275
- [41] Suna S, Nakajima Y, Sanenari F, Nakagawa F. Pollution of cadmium and lead by smoking. *J Shikoku Public Health.* 1988; 33: 149-153.
- [42] Thielen A, Klusb H, Müller L. Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject. *Exp Toxicol Pathol.* 2008; 60(2-3): 141-156. doi: 10.1016/j.etp.2008.01.014
- [43] International Standard (ISO). Rutina analítica máquina de cigarrillos del hotel - Definiciones y condiciones generales. 4th edition. Reference number ISO 3308:2000(E). Ginebra (Suiza); 2000.
- [44] World Health Organization (WHO). Principios orientativos para el desarrollo de capacidad de investigación y prueba de los productos de tabaco, y protocolos propuestos para la iniciación de pruebas de esos productos: recomendación 6 / Grupo de estudio de la WHO sobre la reglamentación de los productos del tabaco. Ginebra (Suiza); 2004.
- [45] Canadian Ministry of Justice. Health Canada, Tobacco Control Programme, Determination of toxic trace metals in sidestream smoke K1A 0K9. Ottawa (Canada); 1999.
- [46] Ajab H, Yaqub A, AkbarMalik S, Junaid M, Yasmeen S, Azmuddin Abdulla M. Characterization of toxic metals in tobacco, tobacco smoke, and cigarette ssh from selected imported and local brands in Pakistan. *Sci World J.* 2014; 2014: 1-5. doi: 10.1155/2014/413614
- [47] Omari MO, Kibet JK, Cherutoi JK, Bosire JO, Rono NK. Heavy metal content in mainstream cigarette smoke of common cigarettes sold in Kenya, and their toxicological consequences. *Int Res J Environment Sci.* 2015; 4(6): 75-79.
- [48] Baker RR. Variation of sidestream gas formation during the smoking cycle. *Beiträge Tabakforschung Int.* 1982; 11(4): 181-193. doi: 10.2478/cttr-2013-0512.
- [49] Tsukada N, Nishikawa A, Horikawa M, Wada Y, Liu, Kamiya H. Emission potential of condensable suspended particulate matter from flue gas of solid waste combustion. *Powder Technol.* 2008; 180(1-2): 140-144. doi: 10.1016/j.powtec.2007.03.024
- [50] Czerniak MR, Easton BC. An investigation of the pyrolysis of dimethylcadmium and diethyltelluride by in-situ gas sampling and analysis. *J Cryst Growth.* 1984; 68(1): 128-135. doi: 10.1016/0022-0248(84)90407-X
- [51] Gerardi AR, Coleman WM. New methodologies for qualitative and semi-quantitative determination of carbon-centered free radicals in cigarette smoke using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass selective detection. *Beiträge Tabakforschung Int.* 2010; 24(2): 58-71. doi: 10.2478/cttr-2013-0882.
- [52] Chang MJ, Naworal JD, Connell CT. Direct introduction of cigarette smoke for puff-by-puff trace metals analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2006; 21(6): 574-581. doi: 10.1039/b602248k.

**Guillén Juan Carlos.** Farmacéutico (2002). Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. Maestría en Química Analítica (2006) y Doctor en Química Analítica (2015) Facultad de Ciencias, ULA. Profesor Agregado de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA (2007 – presente). Docente e investigador con más de 30 trabajos publicados en congresos y en revistas arbitradas e indexadas nacionales e internacionales. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5674-8366>

**Petit de Peña Yaneira.** Licenciada en Química (1984) Facultad de Ciencias, ULA. PhD. Química Analítica Universidad de Córdoba, España y ULA (1995). Profesora Titular, Jubilada, Facultad de Ciencias, ULA. Coordinadora del Postgrado Química Analítica, el Laboratorio de Espectroscopia Molecular y de la Subcomisión Ciencias Química CDCHTA (ULA). Más de 100 trabajos publicados en revistas arbitradas e indexadas y en congresos nacionales e internacionales. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2010-8444>

**Vicuña-Fernández Nelson.** Médico Cirujano (1967) Facultad de Medicina, ULA. Maestría en Farmacología Clínica (1975) Universidad de Emory, Atlanta, EE. UU. Posdoctorado en Farmacología Clínica (1977) Universidad de Texas. San Antonio, EE. UU. Profesor Titular Jubilado de Farmacología y Toxicología, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, ULA. Director de la Escuela de Medicina (1990-1993). Decano de la Facultad de Medicina. ULA (1993-1996). Más de 75 trabajos publicados en revistas arbitradas e indexadas y en congresos nacionales e internacionales. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7012-0812>

**Briceño Luisa Carolina.** Farmacéutico (2005) Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA. Doctor en Química Analítica (2015). Facultad de Ciencias, ULA. Profesor Asistente, adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (2016 – presente), ULA. Con más de 10 trabajos publicados en congresos y revistas arbitradas e indexadas nacionales e internacionales. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8289-5175>

## NORMAS EDITORIALES

La Revista de la Facultad de Farmacia (Rev Fac Farm) es una publicación editada por la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela. La revista es arbitrada e indizada y tiene como objetivo publicar Trabajos Originales (inéditos producto de estudios terminados), Revisiones, Reporte de Casos Clínicos, Comunicaciones y Cartas al Editor, que versen sobre las siguientes áreas del conocimiento: Etnobotánica, Química Orgánica, Química Inorgánica, Química Analítica, Química Medicinal, Fitoquímica, Ciencias de los Alimentos, Galénica, Tecnología Industrial, Análisis de Medicamentos, Física, Físicoquímica, Estadística Aplicada a las Ciencias de la Salud, Microbiología, Parasitología, Inmunología, Hematología, Farmacología, Toxicología, Fisiología, Citología, Farmacocinética, Mercadotecnia, Historia de la Farmacia y Bioanálisis, Farmacognosia, Nutrición en Salud Pública y Biotecnología. Los manuscritos deben ser concisos, correctos en su estilo y escritos en idioma español, inglés o portugués. El Comité Editorial (CE) tiene prevista la publicación de un volumen y dos números al año, con la extensión que se estime conveniente.

### ENVÍO DEL MANUSCRITO

Los autores deben enviar el archivo del manuscrito en programa "Word for Windows" a través de los siguientes correos: revfarm@ula.ve o revfarmacia@gmail.com. Es necesario que el autor principal envíe una comunicación al Editor, en donde solicita la consideración del material adjunto para la publicación en alguna de las secciones de la Revista, con indicación expresa, de tratarse de un trabajo original, de no haber sido publicado excepto en forma de resumen y que sólo ha sido enviado a la Revista de la Facultad de Farmacia. Además, debe incluir la autorización, donde todos los autores aceptan con su firma, que han participado activamente en el desarrollo y ejecución de dicha investigación, y que conocen que está siendo enviado a publicación sin percibir remuneración alguna.

### SISTEMA DE ARBITRAJE

Todos los trabajos serán sometidos a consideración del CE de la Revista, el cual decidirá si el trabajo debe ser enviado a arbitraje o es devuelto por no cumplir con las normas editoriales establecidas. El arbitraje de doble ciego será realizado por al menos tres expertos en el área objeto de la comunicación. Se cuenta con la participación de especialistas, provenientes de diferentes instituciones locales, nacionales, así como internacionales. En caso de existir sugerencias por parte de los evaluadores para mejorar la calidad de los trabajos, serán devueltos a sus autores para las debidas correcciones, las cuales deben cumplirse, siendo posible apelar con la debida justificación en cada caso. Para facilitar el proceso de arbitraje, los autores deberán enviar una lista de seis posibles árbitros (Nacionales e Internacionales) con sus respectivas direcciones de correo electrónico.

### NORMAS EDITORIALES

Los textos deben estar compuestos por las siguientes secciones:

**Revisiones:** Según los criterios establecidos por el CE, para incluir revisiones en la Revista de la Facultad de Farmacia se debe cumplir con las siguientes condiciones:

- Al menos uno de los autores debe tener un mínimo de tres trabajos sobre el tema, publicados en revistas indexadas y arbitradas y por lo menos una de esas revistas debe ser Tipo A.
- Las revisiones pueden ser solicitadas al autor (es) por el CE o propuestas por el autor (es) al CE, sobre temas seleccionados. Estructura: Resumen, palabras clave, abstract, key words, introducción, cuerpo o desarrollo, conclusión (es), referencias bibliográficas, de acuerdo a las mismas instrucciones de los trabajos originales.

**Trabajos originales:** Se le da prioridad a los artículos originales. Estructura: Resumen, palabras clave, abstract, key words, introducción, material y métodos, resultados, discusión, conclusión (es), agradecimientos (prescindible) y referencias bibliográficas,

# REGLAMENTO PARA EL ARBITRAJE

## CAPÍTULO 1

### *Disposiciones Fundamentales*

**Artículo 1.** El presente **REGLAMENTO** tiene por objeto normar los principios rectores del Arbitraje de los Trabajos de Investigación, enviados por autores al Editor para su aceptación en la Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes.

**Artículo 2.** La recepción de un Trabajo de Investigación por parte del Editor, no implica por fuerza su aceptación para ser publicado en cualquiera de los volúmenes de la Revista de la Facultad que se editen en un año. Además, no se recibirán trabajos para arbitraje que no estén acompañados de un oficio dirigido al Editor de la Revista, firmado por el autor (o responsable de una publicación en caso de ser colectiva).

**Artículo 3.** El Editor podrá recibir trabajos de investigación para su Arbitraje de cualquier autor de algunas de las Facultades de la Universidad de Los Andes, en primera instancia. En segundo lugar, de cualquier autor adscrito a cualquier universidad pública o privada del país. En tercer lugar, de autores de universidades extranjeras con preeminencia de América Latina.

**Artículo 4.** El Editor se reserva el Derecho de Admisión de los trabajos con base en lo establecido en el presente **REGLAMENTO**, y en las Instrucciones para los Autores, publicada en cada volumen editado de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 5.** El Editor no recibirá para su consideración de arbitraje trabajos divulgativos en cualquiera de las áreas de competencia de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 6.** El Editor aceptará para su arbitraje trabajos de investigación documental con aportes sustanciales al conocimiento científico de cualquiera de las áreas de competencia de la Revista de la Facultad de Farmacia, y que se ajusten a lo estipulado en las Instrucciones para los autores.

## CAPÍTULO 2

### *De los Árbitros y de su Competencia*

**Artículo 7.** El número de miembros del Comité de Arbitraje estará supeditado a las áreas de

competencia de la Revista de la Facultad de Farmacia. En todo caso, algunos miembros del Comité podrán fungir como representantes hasta de tres áreas del conocimiento, de acuerdo con su formación y experiencia científica, y será potestad del Editor su designación.

**Artículo 8.** Los miembros del Comité de Arbitraje podrán ser miembros del personal docente y de investigación de la Universidad de Los Andes, o de cualquier otra universidad pública o privada de la República de reconocida actividad científica y académica, con estudios de cuarto nivel.

**Artículo 9.** Podrán ser miembros del Comité de Arbitraje reconocidos investigadores de universidades extranjeras, cuyas instituciones mantengan convenios de cooperación y de intercambio con la Universidad de Los Andes.

**Artículo 10.** Podrán ser miembros del Comité de Arbitraje de la Revista de la Facultad de Farmacia investigadores sin estudios de cuarto nivel, siempre que hayan sido reconocidos por su actividad de investigación dentro o fuera de la institución a la que estén adscritos.

**Artículo 11.** El Editor seleccionará con base en lo expuesto en los Artículos: 7, 8 y 9 del presente **REGLAMENTO**, a los investigadores que conformarán el Comité de Arbitraje de la Revista de la Facultad de Farmacia por un periodo no mayor de dos años consecutivos, pudiendo solicitar a motu proprio su reinserción dentro del Comité a algunos de los miembros salientes o por iniciativa de éstos.

**Artículo 12.** Son funciones de los árbitros, las siguientes:

a) Evaluar los trabajos de investigación de sus áreas de competencia.

b) Enviar al Editor una respuesta por escrito del trabajo considerado, en un plazo no mayor de 30 días, contados a partir de la recepción del texto.

c) Aprobar o improbar los trabajos recibidos, con base a argumentos científicos proclives a ser revisados.

d) No establecer con los autores de los trabajos ninguna comunicación referida al texto que evalúa, que conlleve interferencias y subjetividades en el

proceso. Aplicar en la evaluación argumentos científicos objetivos que permita al Editor a posterior iniciar un proceso de retroalimentación positiva con los autores, a los fines de la excelencia y transparencia del trabajo científico, y de la proyección de la Revista de la Facultad de Farmacia.

e) Aplicar en la evaluación los parámetros especificados en la Guía para los Árbitros.

**Artículo 13.** Los árbitros tienen derecho a recibir a cambio de su trabajo de evaluación, una constancia expedida por el Editor, a los fines de su inclusión en procesos de reconocimiento de los méritos académicos y científicos de los miembros del personal docente y de investigación de las universidades representadas en el Comité de Arbitraje.

### CAPÍTULO 3

#### *Disposiciones Finales*

**Artículo 14.** El Editor podrá sustituir en cualquier momento a algún miembro del Comité de Arbitraje, cuando éste no haya cumplido con lo dispuesto en el presente **REGLAMENTO**. El Editor procederá de inmediato a sustituir al miembro excluido con base a lo dispuesto en los Artículos: 7, 8 y 9 del presente **REGLAMENTO**, y a notificar de inmediato su remoción al saliente.

**Artículo 15.** Los autores tendrán derecho a solicitar reconsideración de la evaluación de su trabajo de investigación cuando haya resultado improbadado por un miembro del Comité de Arbitraje. A tales efectos, el Editor enviará el trabajo en cuestión a ser evaluado a otro árbitro. En caso de resultar positiva la segunda evaluación, el Editor se reservará el derecho de publicar o no el trabajo sin más opiniones de expertos, con base a la disponibilidad de espacio en la Revista en el volumen que juzgue conveniente, y así se lo hará saber al autor.

**Artículo 16.** Con base en lo dispuesto en el Artículo anterior, las decisiones de los árbitros son inapelables y de obligatorio acatamiento por parte del autor.

**Artículo 17.** Los miembros del Comité de Arbitraje no percibirán remuneración económica alguna por su trabajo.

**Artículo 18.** Los trabajos de investigación recibirán respuesta escrita a partir de los 60 días hábiles de su recepción.

**Artículo 19.** Si el informe de arbitraje es positivo para un trabajo en primera instancia, el Editor se compromete a incluirlo en el volumen inmediatamente próximo de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 20.** El Editor se arroga la potestad de realizar observaciones de forma a los trabajos recibidos antes de ser enviados a arbitraje, de tal manera que el autor se compromete a acatarlas sin desmedro de la trascendencia o alcance científico del trabajo.

**Artículo 21.** El autor se hace responsable de cualquier errata de forma y de fondo que esté incluida en el original enviado al Editor; y éste no se compromete a dar Fe de Errata en tales circunstancias.

**Artículo 22.** El Editor se compromete a dar Fe de Errata en aquellas circunstancias en que por inadvertencia o fallas técnicas se haya incurrido en un error no incluido en el original (papel y electrónico) enviado para su consideración por el autor. Tal procedimiento se patentizará en el volumen inmediatamente siguiente a la emisión del error, siempre y cuando el autor se lo haga saber al Editor por escrito tres meses antes de la edición del siguiente volumen de la Revista de la Facultad de Farmacia.

**Artículo 23.** El Editor no se compromete a expedir constancias de trabajos recibidos sin que haya finalizado el proceso de arbitraje y se cuente con un informe escrito y firmado por el árbitro.

**Artículo 24.** Lo establecido en el presente **REGLAMENTO** será difundido en la Revista de la Facultad de Farmacia, de tal forma, que tanto autores como árbitros se solidaricen con lo aquí expuesto.

## ÍNDICE ACUMULADO

### Volumen 57(2)

Año 2015

**Composición química del aceite esencial de hojas frescas de *Annona muricata* L., de Mérida, Venezuela.**

Meccia C., Gina; Vit Olivier, Patricia; Rojas, Luis B.; Carmona Arzola, Juan; Santiago Silva, Bertha y Usubillaga, Alfredo.

**Estudio del crecimiento bacteriano. Enfoque de análisis de datos con medidas repetidas.**

Peña G. Jesús A; Rosales O., Yolima Beatriz y Orlandoni M., Giampaolo.

**Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa para la cuantificación de hidroclorotiazida y clorhidrato de propranolol en formas farmacéuticas sólidas.**

Guillén Guillén, Ana; Brunetto, Rosario; León Leal, Andrés; Gallignani, Maximo A.; Lobatón Álvarez Robert; Colón U., Sarín y Calderón G., Laura M.

**Extracción y caracterización de grasa y almidón de la almendra de mango variedad Alphonso (*Mangifera indica* L).**

Gutiérrez, Carlos; Rivera, Yezabel; Gómez, Rubén; Bastidas, Vanessa y Izaguirre, César.

### Volumen 58(1)

Año 2016

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar.**

Rojas, Janne; Velasco Carrillo, Judith; Buitrago D., Alexis A.; Mender, Tamara y Rojas, John.

**Fasciolosis y parásitos gastrointestinales en becerros de la Estación Experimental "ElJoque" Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.**

González Ramírez, Luisa Carolina; Martínez, Asdrúbal; Assouad, Manuel; Álvarez, Janeth; Gil, Florimar; Castro Vera, Trino Alberto; Pérez De Pablos, Carlos y Dávila, Ciro.

**Estudio fitoquímico y actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.**

Mogollón, José Ángel; Rondón, María Eugenia; Morales Méndez, Antonio y Contreras Moreno, Billmary Z.

**Comparación de los perfiles de disolución de cápsulas de cefadroxilo comercializadas en Venezuela.**

Colón U., Sarín; Guillén, Ana; Peña, Jesus Alberto; Lobatón Álvarez, Robert; León, Andrés y Calderón G., Laura M.

### Volumen 58(2)

Año 2016

**Composición química y perfil mineral de materias primas de origen animal y vegetal utilizadas en la formulación de dietas para la alimentación de alevines de *Colossoma macropomum*.**

Morillo, Marielba; Visbal, Tomas; Vielma, Rosa Alba; Peña, Liz; González, Isbelia y Medina, Ana Luisa.

**Estudio fitoquímico de la resina de *Protium carana* March (Burseraceae), derivados semisintéticos de los triterpenos  $\alpha/\beta$ -amirinas, determinación de su actividad antioxidante y actividad antibacteriana.**

Bracho Niño, Ismer; Rojas, Luis B.; Usubillaga, Alfredo; Carmona Arzola Juan; Carrero, José; Hernández, Johanna; Deffieux, Denis; Pouységu, Laurent y Quideau, Stéphane.

**Uso de chachafruto (*Erythrina edulis*) y soya (*Glycine max*) como sustituto de la harina de pescado en la formulación de dietas para alevines de coporo (*Prochilodus mariae*).**

Visbal, Tomas; Morillo, Marielba; Rial, Leandra; Altuve, Daisy; Betancourt, Carlos y Medina, Ana Luisa.

**Evaluación sensorial de lonjas de jamón cocido y pechuga de pavo, recubiertas con películas antimicrobianas de alginato de sodio.**

Rosales O., Yolima Beatriz; Raybaudi Massilia, Rosa; Medina, Ana Luisa; Mosqueda Melgar, Jonathan y Tomé, Elisabetta.

**Volumen 59(1)**

**Año 2017**

**Composición química del aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium* L. colectada en Tovar-Edo. Mérida, Venezuela.**

Rojas Fermín, Luis; Rojas Vera, Janne; Cordero de Rojas, Yndra; Handan, Mager y Carmona Arzola, Juan.

**Determinación voltamétrica de citrato de sildenafil en formulaciones farmacéuticas.**

Ortiz, Reynaldo; Nava, Lismar; Martínez, Yris J.; Weinhold, Elkis y Paredes R., Andreina.

***In vivo* anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*.**

Rios Tesch, Nurby Nahiely; Villalobos Osorio, Darly Coromoto; Rojas Fermín, Luis; Aparicio Z., Rosa L.; Usubillaga, Alfredo; Mitaine Offer, Anne Claire; Lacaille Dubois, Marie Aleth; Denis, Deffieux; Peixoto, Philippe; Laurent, Pouységu y Stéphane, Quideau.

**Composición química del aceite esencial de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC de los Andes Venezolanos.**

Buitrago B., Diolimar; Morales M., Antonio; Rojas Fermín, Luis; Aparicio Z., Rosa L. y Meléndez G., Pablo.

**Volumen 59(2)**

**Año 2017**

**Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec**

Cordero de Rojas, Yndra; Lucena de Ustáriz, María Eugenia; Araujo, Liliana; Usubillaga, Alfredo; Rojas Fermín, Luis y Moujir, Laila.

**Actividad anti-inflamatoria del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq.**

Hernández Bastidas, Vanessa; Mora V., Flor D.; Nicola, Malafronte y Nunziatina De Tommasi.

**Constituyentes volátiles de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling de los Andes venezolanos.**

Pérez Colmenares, Alida; Rojas Fermín, Luis y Usubillaga, Alfredo.

**Actividad antiinflamatoria in vivo de extractos de hojas, tallos y frutos de *Ficus maitin* Pittier.**

Villalobos Osorio, Darly Coromoto; Rios, Nurby, Ramírez González, Irama Judith y Meléndez, Pablo.

**Volumen 60(1)**

**Año 2018**

**Evaluación del balance del contenido vaginal para el diagnóstico de la disfunción vaginal.**

Muñoz, Jesús; Sánchez, Kiralba y Babino Cynthia.

**Actividad antimicrobiana y perfil fitoquímico de las hojas de *Connarus venezuelanus* B. var. *venezuelanus* (Connaraceae R. BR.).**

García Giovanni; Rodríguez Castillo Gabriela; Velasco Carrillo, Judith; Villalobos Osorio, Darly Coromoto y Ramírez González, Irama Judith.

**Valoración del efecto de la Erdosteina en cuadros de intoxicación con Paraquat en ratas BIOU: Wistar y comparación con la N-acetilcisteína mediante determinación de malondialdehído por Espectroscopia UV.**

Di Bernardo, María L.; Zambrano de Dávila Thania; Morales Yasmin; Brito Sulay; Rojas de Marin, Tibisay del Carmen; Montero Yepsy; Osorio Andrés y Montoya Dubelia.

**Perfil de textura instrumental y sensorial de pastas elaboradas con *Cajanus cajan* fermentada.**

Vivas Odry y Sangronis Elba.

**Volumen 60(2)**

**Año 2018**

**Fenoles totales, contenido de flavonoides y actividad antioxidante de los extractos etanólicos de plantas ecuatorianas.**

Rondón, María; Moncayo, Shirley; Cornejo, Xavier y Plaza, Claudia.

**Un modelo de supervivencia bivariante para eventos dependientes bajo el enfoque de funciones cópulas.**

Peña G., Jesús A; Ramoni P., Josefa y Giampaolo, Orlandoni.

**Estudio de la composición química de los aceites esenciales de las hojas y flores de *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. (Lamiaceae).**

Araque, Emmanuel; Urbina, Daniela; Morillo, Marielba; Rojas Fermín, Luis y Carmona Arzola, Juan.

**Revista de la Facultad de Farmacia. Seis décadas de trayectoria.**

Gil Otaiza, Ricardo.

**Volumen 61(Edición Especial)**

**Año 2019**

**Análisis de supervivencia con interacción de diabetes e índice de masa corporal en pacientes en diálisis peritoneal.**

Borges P., Rafael E.; Torres-Mantilla, Hugo Alexander y González-Villar, Andrea.

**Evolución del error total en la determinación de glucosa en un laboratorio de bioquímica clínica.**

Molina, Karla; Torres, Jeymmy; López, María; Hurtado, María; Guillén, Leidys y Dugarte, Freddy.

**Actividad larvicida de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y *Lepechinia bullata* contra *Tecia solanivora* Povolny.**

Ramírez, Rosslyn N.; Mora V., Flor D.; Domínguez, Ilka; Rojas Fermín, Luis; Ramírez, Wilson; Peña, José y Pérez Colmenares, Alida.

**Composición química y actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Leonurus japonicus* (Houtt.).**

Malave, María José; Mendoza, Zulimar; Morillo, Marielba; Visbal, Tomas; Rondón, María Eugenia y Carmona Arzola, Juan.

**Volumen 62(Edición Especial)**

**Año 2020**

**Perfil fitoquímico, actividad biológica y fotoprotectora de las flores de *Aldama dentata* La Llave et Lex.**

Isla Marylenlid, Pérez Alida, Obregon Ysbelia, Aparicio Rosa, Cordero Yndra, Díaz

Clara, Isla José, Chacón Carmen, Fernández Jhender, Rojas-Fermín Luis.

**Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana de fracciones de diferentes polaridades obtenidas de *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch y *Vismia macrophylla* Kunth.**

Buitrago-Díaz Alexis Alberto, Rojas-Vera Janne, Velasco-Carrillo Judith.

**Valoración de dietas a base de *Leucaena leucocephala* (Lam.), *Machaerium* sp y *Glycine max* (Soya) para la alimentación de alevines de *Colossoma macropomum* (cachama negra).**

Visbal Tomas, Morillo Marielba, Rial Leandra, Betancourt Carlos, Medina Ana Luisa.

**Actualización de la imagen de la Revista de la Facultad de Farmacia.**

Rojas-Vera Janne, Buitrago-Díaz Alexis, Meccia Gina, Rondón María Eugenia, Rojas Julio.

**Volumen 63(1)**

**Año 2021**

**Actividad antioxidante y garrapaticida de los extractos de las hojas de *Bixa orellana* L.**

Chacón Arian, Morillo Marielba, Rondón María, Hernández Vanessa, Carmona Juan, Visbal Tomás.

**Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador.**

Moncayo Shirley, Rondón María, Araujo Liliana, †Rojas Luis, Cornejo Xavier, Guamán Walter, Jaramillo Soraya.

**Microbiología del agua perteneciente al lago cratérico volcánico Cuicocha. Imbabura. Ecuador: Estudio inicial.**

González Marco, Alarcón Diego, Araque Judith, Viteri Francisco, Villacis Luis, Escobar Sandra, Araujo Liliana, Medina Gerardo, Andueza Félix.

**Estudio preliminar de la calidad nutracéutica y autenticidad de la miel con base en parámetros bioquímicos y capacidad antioxidante.**

Pérez-Pérez Elizabeth, Daboin María, Pérez Mariel, Peña-Vera María, Dávila Juan, Sulbarán-Mora Miguel.

**Volumen 63(2)**

**Año 2021**

**Informe de la citología mamaria.**

Toro de Méndez Morelva.

**Textura y análisis descriptivo cuantitativo de galletas elaboradas con harinas de granos fermentados de *Phaseolus vulgaris* o *Cajanus cajan*.**

Vivas Odry, Sangronis Elba.

**Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los bulbos de *Crinum moorei* Hook F.**

Rojas-Vera Janne, Buitrago-Díaz Alexis Alberto, Velasco-Carrillo Judith.

**Calidad fisicoquímica de los lagos Colta y Cuicocha ubicados en la alta montaña del Ecuador.**

González Marco, Vásquez Paola, Alarcón Diego, Araque Judith, Viteri Francisco, Villacis Luis, Pinto Gustavo, Escobar Sandra, Medina Gerardo, Andueza Félix.

**Volumen 64(1)**

**Año 2022**

**Actividad antioxidante y composición química del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Benth.) Griseb de Ecuador.**

Toaquiiza-Aguagallo Cecilia, Cando-Brito Verónica, †Rojas-Fermín Luis, Pérez-Colmenares Alida, Aparicio-Zambrano Rosa, Obregón-Díaz Ysbelia

**Actividad antioxidante de los extractos alcohólicos de los frutos de las especies *Manilkara achras* (Mill.) Fosberg (níspero); *Averrhoa carambola* L. (tamarindo chino) y *Spondias mombin* L. (jobo).**

Tolozá Luis, Ramírez Jesús, Rondón María.

**Derivados hemisintéticos del *ent*-kaurenol y evaluación de su actividad antimicrobiana.**

Hamdan-Sánchez Mager, †Rojas-Fermín Luis, Obregón-Díaz Ysbelia, Aparicio-Zambrano Rosa, Pérez-Colmenares Alida, Cordero Yndra, Díaz Clara, Da Silva-. Rojas Jossblerys, Usubillaga Alfredo.

**Análisis químico cualitativo y actividad ecotóxica de la especie *Tristerix longibracteatus* (Desr.) Barlow & Wiens (Loranthaceae) colectada en Chimborazo, Ecuador.**

Espinoza Carlos, Rojas Janne, Buitrago-Díaz Alexis, Morillo Marielba, Visbal Tomas.



**CONSEJO DE DESARROLLO CIENTÍFICO  
HUMANÍSTICO, TECNOLÓGICO Y DE LAS ARTES  
Cdchta**



El **Cdchta** es el organismo encargado de promover, financiar y difundir la actividad investigativa en los campos científicos, humanísticos, sociales y tecnológicos.

**Objetivos Generales:**

El **Cdchta**, de la Universidad de Los Andes, desarrolla políticas centradas en tres grandes objetivos:

- Apoyar al investigador y su generación de relevo.
- Vincular la investigación con las necesidades del país.
- Fomentar la investigación en todas las unidades académicas de la ULA, relacionadas con la docencia y con la investigación.

**Objetivos Específicos:**

- Proponer políticas de investigación y desarrollo científico, humanístico y tecnológico para la Universidad. Presentarlas al Consejo Universitario para su consideración y aprobación.
- Auspiciar y organizar eventos para la promoción y la evaluación de la investigación.
- Proponer la creación de premios, menciones y certificaciones que sirvan de estímulo para el desarrollo de los investigadores.
- Estimular la producción científica.

**Funciones:**

- Proponer, evaluar e informar a las

Comisiones sobre los diferentes programas o solicitudes.

- Difundir las políticas de investigación.
- Elaborar el plan de desarrollo.

**Estructura:**

- Directorio: Vicerrector Académico, Coordinador del **Cdchta**.
- Comisión Humanística y Científica.
- Comisiones Asesoras: Publicaciones, Talleres y Mantenimiento, Seminarios en el Exterior, Comité de Bioética.
- Nueve subcomisiones técnicas asesoras.

**Programas:**

- Proyectos.
- Seminarios.
- Publicaciones.
- Talleres y Mantenimiento.
- Apoyo a Unidades de Trabajo.
- Equipamiento Conjunto.
- Promoción y Difusión.
- Apoyo Directo a Grupos (ADG).
- Programa Estímulo al Investigador (PEI).
- PPI-Emeritus.
- Premio Estímulo Talleres y Mantenimiento.
- Proyectos Institucionales Cooperativos.
- Aporte Red Satelital.
- Gerencia.

**Alejandro Gutiérrez  
Coordinador General**

www.ula.ve/cdcht / E-mail: cdcht@ula.ve  
Telf. 0274-2402785 / 2402686

## AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

### Decano(e)

Dra. Angela Lugo

### Director de la Escuela de Bioanálisis

MSc. María Evelyn Alviarez Vargas

### Director de la Escuela de Farmacia

MSc. Robert Lobatón

### Director del Instituto de Investigaciones

Dra. Yndra Cordero

### Director de la Oficina de Relaciones

### Interinstitucionales

Dr. José Nelson Aranguren

La Revista de la Facultad de Farmacia, posee acreditación del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes. Universidad de Los Andes-Venezuela (CDCHTA-ULA).

Esta publicación está indizada en REVENCYT, Sistema de Publicaciones Scielo, Periódica (UNAM- México), IMBIOMED, Base de datos LILACS producida por BIREME y LIVECS, y Latindex México.

Incluida en el Registro de Publicaciones Científicas y Tecnológicas del FONACIT.

ISSN 0543- 517-X Depósito Legal pp 1958 02 ME 1003

ISSN 2244-8845 Electrónico Depósito Legal ppi 2012 02 ME 4102.

La Revista de la Facultad de Farmacia se exime de compromisos con la opinión y enfoques vertidos por los autores de los materiales publicados en ella. Queda prohibida, sin la autorización del Comité Editorial, la reproducción total o parcial de los trabajos incluidos en este volumen, por cualquier medio. La misma asegura que los editores, autores y árbitros cumplen con las normas éticas internacionales durante el proceso de arbitraje y publicación. Del mismo modo aplica los principios establecidos por el Comité de Ética en Publicaciones Científicas (COPE). Igualmente, todos los trabajos están sometidos a un proceso de arbitraje y de verificación por plagio.

## COMITÉ EDITORIAL

### EDITORA

Dra. Janne Rojas

Instituto de Investigaciones

### EDITORES HONORARIOS

Dr. Alfredo Usubillaga

Instituto de Investigaciones

Dr. Ricardo Gil Otaiza

Dpto. de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos

Dra. Beatriz Nieves Blanco

Dpto. de Microbiología y Parasitología

### CUERPO EDITORIAL

Dr. Alexis A Buitrago Díaz

(Diagramación)

Dpto. de Análisis y Control

Dr. Julio Rojas

Dpto. de Toxicología

Dra. María Eugenia Rondón

Dpto. de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos

MSc. Gina Meccia,

Instituto de Investigaciones

### REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA

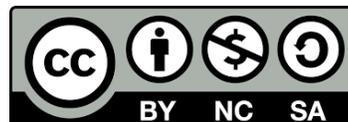
#### Dirección de Canje (Postal address)

Prolongación Av. Humberto Tejera, Sector Campo de Oro, detrás del IAHULA, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Edificio Carlos Edmundo Salas, 1er piso. ULA. Mérida. República Bolivariana de Venezuela. Código Postal 5101 Teléfono: +58-274-2403561.

Fax: +58-274-2403568

Dirección electrónica:

revfarm@ula.ve o revfarmacia@gmail.com



### REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Universidad de Los Andes Facultad de Farmacia y Bioanálisis Biblioteca "Ismael Valero"

Esta versión digital de la revista de la Facultad de Farmacia, se realizó cumpliendo con los criterios y lineamientos establecidos para la edición electrónica en el año 2020.

Publicada en el repositorio institucional SaberULA

Universidad de Los Andes-Venezuela

[www.saber.ula.ve](http://www.saber.ula.ve), [info@saber.ula.ve](mailto:info@saber.ula.ve).

