

Desarrollo y validación de un método por RP-HPLC para la determinación de clorhidrato de verapamilo en tabletas recubiertas

Development and validation of method for RP-HPLC for the determination of verapamil hydrochloride coated tablet

MARISABEL BOR*, PATRICIA BAFFI

Resumen

Se desarrolló y validó un método por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC), sencillo, rápido, reproducible e indicativo de la estabilidad para la cuantificación del clorhidrato de verapamilo en tabletas cubiertas. La fase móvil consistió en una mezcla de buffer fosfato monobásico de amonio 0,05 M: acetonitrilo en la proporción (58:42) a pH= 5,3. El flujo de fase móvil fue de 1,5 mL/min. Se empleó una columna cromatográfica en fase inversa (C18). La detección se realizó empleando un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 280 nm. El uso del detector de diodos permitió realizar el análisis de pureza de pico en las pruebas de degradación forzada; en dicho análisis se encontraron diferencias espectrales en la primera fase para las muestras sometidas a calor y radiación visible durante siete días, estas diferencias podrían atribuirse a la presencia de productos de degradación. Los resultados obtenidos con el método analítico propuesto para la evaluación de tabletas recubiertas de clorhidrato de verapamilo 80 mg permiten cuantificar el fármaco con un alto grado de confianza. El método analítico desarrollado y validado se puede aplicar como un indicador de estabilidad y un método rutinario para pruebas de control de calidad.

Palabras clave: Validación, Clorhidrato de verapamilo, indicadores de estabilidad, RP-HPLC, Control de Calidad.

Abstract

An analytical methodology by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with diode array detection for quantification of verapamil hydrochloride coated tablets, simple, rapid, reproducible and stability indicating for the quantification of verapamil hydrochloride tablets covered was developed and validated. The mobile phase consisted of a mixture of 0.05 Monobasic ammonium phosphate buffer: acetonitrile in the ratio (58:42) at pH = 5.3. The mobile phase flow was 1.5 mL/min. Column chromatography was used for reverse phase (C-18). Detection was performed using a diode array detector at a wavelength of 280 nm. The use of diode detector allowed us to perform peak purity analysis in forced degradation. Testing and spectral differences were found in the first phase for samples subjected to heat and visible radiation for seven days. These differences may be attributed to the presence of degradation products. The obtained results with the proposed method for evaluating verapamil coated tablets 80 mg allows us to quantify the drug with a high degree of confidence analytical method. The developed and validated analytical method can be applied as a stability indicator and routine method for quality control testing.

Keywords: Validation, Verapamil hydrochloride, Stability indicating, RP-HPLC, Quality Control.

Introducción

Clorhidrato de verapamilo es un bloqueador de los canales de calcio, perteneciente a la clase de las fenilalquilaminas. Está clasificado dentro de la clase IV de agentes antiarrítmicos. La molécula contiene un carbono asimétrico y es clínicamente administrado

como una mezcla racémica. Verapamilo es ampliamente utilizado en taquiarritmias supraventriculares, angina de pecho, cardiomiopatía hipertrófica e hipertensión arterial. Su efecto antianginoso se debe al mejoramiento de la oxigenación de los tejidos del miocardio por la dilatación directa de las arterias y

* Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040A Venezuela. Telf. (58)212.6052751. e-mail: marisabel.bor@gmail.com

arteriolas coronarias, su efecto antihipertensivo ocurre gracias a la reducción de la resistencia vascular periférica total y como coadyuvante del tratamiento de la miocardiopatía hipertrófica al mejorar la eyección del ventrículo izquierdo como resultado de la vasodilatación (Katzung y Bertram, 2007). Al reducir la concentración de calcio intracelular se dilatan las arterias coronarias, reduciéndose la frecuencia y la contractilidad cardíaca (Abernethy y Schwartz, 1999). Se han reportado algunos métodos analíticos para la determinación de Verapamilo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC); entre ellos se encuentran: la determinación de Verapamilo y sus metabolitos en fluidos biológicos, utilizando detectores de fluorescencia (Ceccato y col., 1992) y detectores UV (García y col., 1997), la determinación de Verapamilo en plasma humano (Ivanova y col., 2008) y la determinación de Verapamilo, Verapamilo ($^2\text{H}_7$) y sus metabolitos en plasma humano y fluidos intestinales, utilizando la técnica HPLC acoplada a un espectrómetro de masas (Hofmann y col., 2000). En 1997, Valvo y colaboradores reportaron un método analítico por RP-HPLC con detección de diodos para la determinación de sustancias relacionadas a Clorhidrato de Verapamilo en la materia prima. Este método consistió en el uso de una fase móvil compuesta por fosfato dibásico de potasio (pH= 7,20; 0,04M): acetonitrilo, programada bajo gradiente de concentración y una columna en fase inversa desactivada con base (L60), con grupos alquilamida y con tratamiento *endcapped*. Estos investigadores lograron separar 13 compuestos relacionados.

En este trabajo se describe el desarrollo de una nueva metodología analítica y su validación para la determinación de Clorhidrato de Verapamilo en tabletas recubiertas, utilizando la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia. La propuesta consiste en el uso de una fase móvil, compuesta por fosfato monobásico de amonio 0,05 M: acetonitrilo en la proporción (58:42) a pH= 5,3, así como el uso de una columna cromatográfica en fase inversa C18 (L1).

Materiales y métodos

REACTIVOS

Acetonitrilo grado HPLC (Mallinckrodt). Fosfato monobásico de amonio grado analítico (Mallinckrodt). Ácido -fosfórico al 85% (Fischer Scientific). Ácido clorhídrico al 37% (Merck). Peróxido de hidrógeno al 35% (Riedel-de Haën). Hidróxido de sodio (Merck).

PATRÓN

Se empleó un patrón de Clorhidrato de Verapamilo (Sigma-Aldrich), pureza 99% y un patrón de

referencia secundario de Clorhidrato de Verapamilo, pureza 99,94%.

MUESTRAS

Las muestras analizadas corresponden a un producto comercial de clorhidrato de verapamilo 80 mg en tabletas recubiertas, fabricadas en Brasil y distribuidas en el mercado nacional.

EQUIPOS Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis HPLC se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia de la casa comercial Waters®, conformado por una bomba modelo 600E, un inyector automuestreador modelo 717 plus acoplado a un detector de arreglo de diodos modelo PDA 996. El equipo cromatográfico está conectado a un computador con un programa Millennium 32®. Se utilizó una columna cromatográfica de fase inversa μ bondapak C-18 (L1), 3,9x300 mm, 10 μm , 125 Å. Todas las pesadas se realizaron en una balanza analítica digital Mettler Toledo, modelo AG 245. Las mediciones de pH fueron realizadas con el potenciómetro Orion Research modelo 601 A. El agua utilizada para todos los análisis proviene del equipo de destilación Cascada Ro Waters (Pall Corporation) y purificada en el ultrapurificador de agua Barnstead (Nanopure). Todas las muestras fueron filtradas antes de ser inyectadas en el cromatógrafo con membranas de filtración de nylon de 0,45 μm millipore.

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La primera fase del desarrollo del método consistió en realizar una modificación de la fase móvil y la columna cromatográfica empleada por Valvo y col. (1997), dicha fase móvil estaba compuesta por fosfato dibásico de potasio (pH= 7,20; 0,04M): acetonitrilo, programada bajo gradiente de concentración. Las pruebas con esta fase móvil no pudieron realizarse por no contar con las condiciones especificadas en el método ni la columna cromatográfica. La fase móvil que se sometió a pruebas tenía la siguiente composición: fosfato monobásico de amonio 0,05 M: acetonitrilo en la proporción (58:42) a pH= 5,3 bajo un modo isocrático. La fase móvil utilizada fue filtrada previamente con membrana de nylon de 0,45 μm , desgasificada al vacío por 15 minutos y en baño de ultrasonido durante 15 minutos. Todas las inyecciones en la primera fase de prueba fueron realizadas bajo las mismas condiciones de flujo (1,0 mL/min) y volumen de inyección (20 μL). En todos los casos se realizaron inyecciones de un patrón de clorhidrato de verapamilo a una concentración de 0,16 mg/mL disuelto en una solución de acetonitrilo: agua (50:50).

DATOS ESPECTROSCÓPICOS

Los espectros de absorción ultravioleta se obtuvieron realizando barridos de longitudes de onda desde los 220 nm hasta los 400 nm con un detector de arreglo de diodos (Figura 1). La longitud de onda de máxima absorbancia fue de 280 nm.

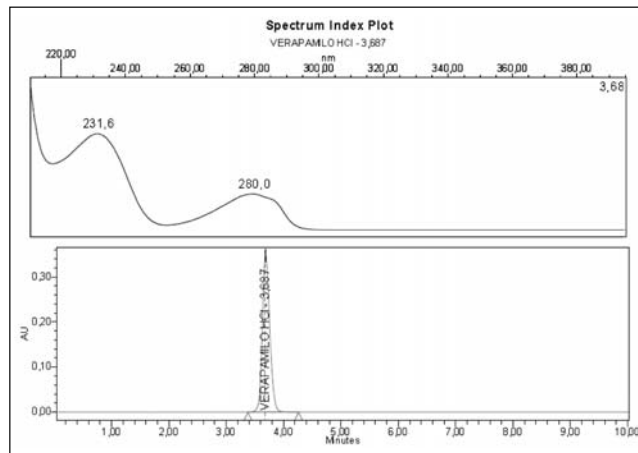


Figura 1. Espectro ultravioleta de clorhidrato de verapamilo en el rango 220 a 400 nm y su cromatograma.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

La validación del método analítico se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en el capítulo general <1225> de la USP 35 - NF 30. Los parámetros evaluados corresponden específicamente a la categoría I para la cuantificación de clorhidrato de verapamilo, estos son: adecuación del sistema, linealidad, especificidad, precisión y exactitud. También se determinó la robustez del método, límites de detección y cuantificación; estas dos últimas a pesar de no estar incluidas dentro de la categoría I, fueron realizadas ya que permiten determinar la sensibilidad del método.

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Se determinó inyectando por sextuplicado el patrón y la muestra a la concentración de 100% (0,32 mg/mL) de la curva de calibración. A partir de los cromatogramas obtenidos se calcularon los valores promedio de área, tiempo de retención, factor de cola (T), factor de capacidad (k) y número de platos teóricos (N) con los coeficientes de variación respectivos.

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados estadísticamente a partir de los datos de la regresión lineal y desviación estándar de la respuesta (Horwitz, 1982). A fin de comprobar experimentalmente si los resultados teóricos eran ciertos

se prepararon soluciones del patrón a las concentraciones teóricas. Para la determinación de los límites de detección y cuantificación experimentales se preparó un patrón de clorhidrato de verapamilo (0,032 mg/mL) en acetonitrilo: agua (50:50), a partir de esta solución fueron preparadas dos nuevas soluciones, la primera a una concentración de 0,005 mg/mL para el límite de detección y la segunda a una concentración de 0,01 mg/mL para el límite de cuantificación experimental. En ambos casos los patrones preparados fueron inyectados por sextuplicado.

LINEALIDAD

Se preparó una solución madre pesando alrededor de 16 mg de patrón de Clorhidrato de Verapamilo en un balón de 25 mL con en una solución acetonitrilo: agua (50:50). La curva de calibración se realizó a partir de diluciones de la solución madre, en el rango de concentraciones de seis niveles comprendido entre 0,06 y 0,51 mg/mL.

ESPECIFICIDAD

La especificidad fue evaluada mediante dos pruebas: evaluación de la pureza de pico cromatográfico y estudios de degradación forzada.

PUREZA DE PICO CROMATOGRÁFICO

Se evaluó la pureza de pico cromatográfico obtenido mediante el uso del detector de arreglo de diodos en 4 fases. La primera fase consistió en comparar el espectro de cada punto del pico cromatográfico con el espectro del ápice y la marca como fase 1. Si encuentra diferencias espectrales evalúa nuevamente el pico tomando en cuenta el espectro del ápice y el espectro de la impureza como referencia y lo marca como fase 2 y así continúa hasta obtener las 4 fases.

DEGRADACIÓN FORZADA

Para comprobar si el método desarrollado es indicativo de la estabilidad, las muestras fueron sometidas a pruebas de estrés, para ello se pesó por sextuplicado el equivalente a un peso promedio de tabletas (280 mg) en balones aforados de 100 mL. Cada muestra se trató como se indica a continuación:

1. Muestra control: no se le realizó ningún tratamiento previo.

2. Termólisis: calentamiento de la muestra en baño de agua a 90 °C durante 4 horas.

3. Hidrólisis alcalina: añadir a la muestra 20 mL de hidróxido de sodio al 4% y dejarlo en reposo durante 7 días.

4. Hidrólisis ácida: añadir a la muestra 20 mL de ácido clorhídrico al 10% y dejarlo en reposo durante 7 días.

5. Fotólisis: exposición de la muestra a radiación visible durante 7 días continuos.

6. Oxidación: añadir a la muestra 20 mL de peróxido de hidrógeno al 35% y dejarlo en reposo durante 7 días.

Una vez culminado el tiempo de exposición, se llevó cada muestra a volumen con una solución acetonitrilo: agua (50:50); la concentración de clorhidrato de verapamilo en las muestras fue de 0,32 mg/mL. Adicionalmente se preparó un patrón control de clorhidrato de verapamilo a la concentración de 0,32 mg/mL. Las muestras fueron filtradas antes de ser inyectadas en el cromatógrafo, se estudiaron los cromatogramas obtenidos y los gráficos de pureza de pico cromatográficos para cada una de las pruebas; esta información permite ratificar la presencia de productos de degradación.

PRECISIÓN

La precisión del sistema se determinó inyectando por sextuplicado el patrón correspondiente al 100% de la curva de calibración. Se calculó el coeficiente de variación de los tiempos de retención y áreas obtenidas.

REPETIBILIDAD

Se determinó preparando seis muestras a la concentración del 100% (0,32 mg/mL) y determinando la cantidad de clorhidrato de verapamilo presente en ellas, utilizando la curva de calibración (figura 4). La repetibilidad del método analítico se determinó mediante el cálculo del promedio y el coeficiente de variación de las seis muestras.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Se realizaron dos réplicas de la muestra y cada una fue inyectada por sextuplicado a la concentración correspondiente al 100% de la curva de calibración (0,32 mg/mL). Se calculó la concentración de clorhidrato de verapamilo en cada una de las muestras y su coeficiente de variación.

EXACTITUD

La determinación de la exactitud se realizó según el método de agregado de estándar, el cual consiste en añadir a las muestras una cantidad conocida de patrón para obtener tres niveles de concentración correspondiente a 80%, 100% y 120% de la curva de

calibración. Se realizaron nueve determinaciones (tres réplicas de las tres concentraciones). Para calcular el porcentaje de recuperación se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = (C_{\text{fortificada}} - C_{\text{sin fortificar}}) * 100 / C_A$$

Donde C_A es la concentración del analito añadido.

ROBUSTEZ

El empleo del diseño de la matriz de Plackett y Burman (1946), permitió estudiar el efecto que tienen las variables seleccionadas (variación de flujo, pH y proporción de acetonitrilo en la fase móvil) las cuales fueron modificadas deliberadamente. Para reconocer si la variable tiene influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de la desviación estándar y la raíz de 2 (Quattrochi y col., 1992):

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

Resultados y discusión

ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Los resultados para evaluar la adecuación del sistema cromatográfico basado en los valores de tiempo de retención, área, factor de capacidad (k), factor de cola (T) y número de platos teóricos (N) para el clorhidrato de verapamilo en patrón y la muestra, se presentan en las Tablas I y II, respectivamente. Los coeficientes de variación de los parámetros evaluados fueron menores al 2%. Estos resultados indican que el sistema cromatográfico es adecuado para realizar el análisis.

Tabla I

Resultados de la adecuación del sistema para el análisis de clorhidrato de verapamilo (Patrón)

Inyección	Tiempo de retención (min)	Área	Factor de cola	k	Nro de platos teóricos
1	3,65	3177215	1,29	2,63	3815
2	3,62	3187327	1,29	2,62	3805
3	3,63	3159695	1,30	2,63	3797
4	3,59	3146223	1,29	2,59	3787
5	3,59	3141532	1,28	2,59	3720
6	3,61	3165836	1,29	2,60	3701
Promedio	3,61	3162971	1,29	2,61	3771
S	0,02	17636	0,01	0,02	48
CV	0,45	1	0,54	0,60	1

S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación.

Tabla II
Resultados de la adecuación del sistema
para el análisis de clorhidrato de verapamilo
(Muestra)

Inyección	Tiempo de retención (min)	Área de cola	Factor	k	Nro de platos teóricos
1	3,555	3218955	1,14	2,5500	3495
2	3,554	3224563	1,14	2,5500	3508
3	3,558	3234947	1,14	2,5600	3543
4	3,556	3240378	1,14	2,5600	3469
5	3,555	3242122	1,14	2,5600	3559
6	3,563	3253903	1,15	2,5600	3522
Promedio	3,557	3235811	1,14	2,5600	3516
S	0,003	12644	0,01	0,0001	33
CV	0,09	0,4	0,53	0,1300	1

S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación.

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los valores de los límites de detección y cuantificación se calcularon estadísticamente a partir de los datos de regresión lineal y la desviación estándar de la respuesta, obteniéndose valores de 0,012 mg/mL y 0,032 mg/mL, respectivamente. Se prepararon patrones de clorhidrato de verapamilo a las concentraciones teóricas y a partir de ellas se realizaron diluciones para determinar experimentalmente ambos límites. En las figuras 2 y 3 se presentan los cromatogramas correspondientes a la determinación del límite de detección y cuantificación experimentales, respectivamente. El límite de detección experimental para el clorhidrato de verapamilo fue de 0,005 mg/mL con un coeficiente de variación de 2,610% y el límite de cuantificación experimental fue de 0,01 mg/mL con un coeficiente de variación de 0,70%.

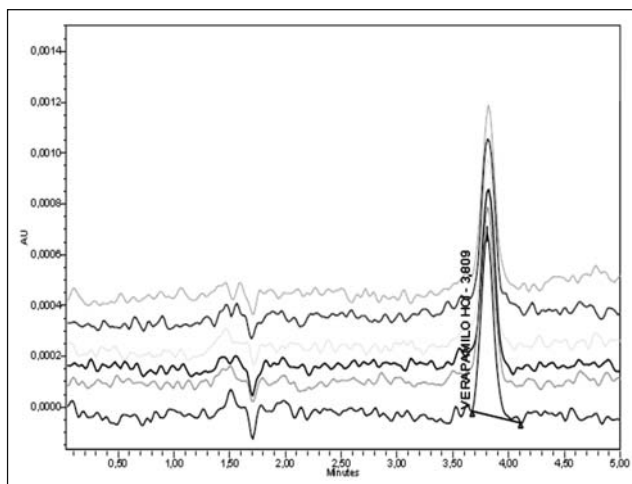


Figura 2. Cromatograma de la solución de clorhidrato de verapamilo a una concentración de 0,005 mg/mL para la determinación del límite de detección experimental.

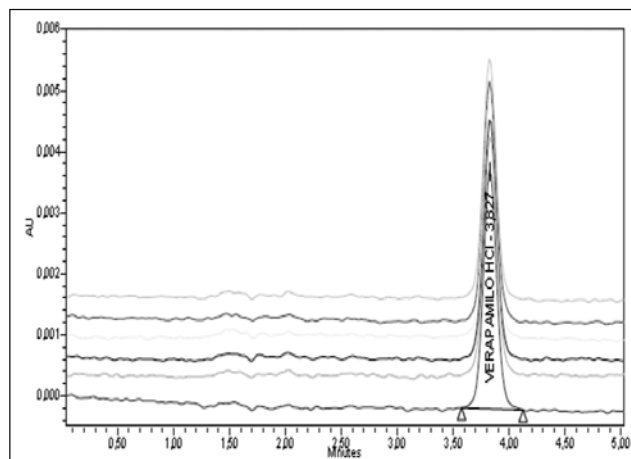


Figura 3. Cromatograma de la solución de clorhidrato de verapamilo a una concentración de 0,001 mg/mL para la determinación del límite de detección experimental.

LINEALIDAD

La curva de calibración fue realizada en un rango de concentraciones de seis niveles, comprendido entre 0,064 y 0,51 mg/mL. En la figura 4 se presenta la curva de calibración obtenida. El criterio de aceptación indica que el coeficiente de correlación debe ser mayor o igual a 0,999. Los resultados obtenidos indican que el método es lineal, ya que el coeficiente de correlación obtenido fue mayor a 0,999.

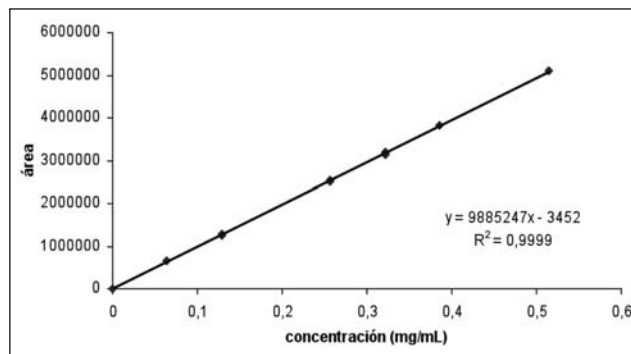


Figura 4. Curva de calibración obtenida para el estándar de clorhidrato de verapamilo en un rango de concentración 0,064 y 0,51 mg/mL, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas.

ESPECIFICIDAD

PUREZA DE PICO CROMATOGRÁFICO

En la figura 5 se presenta el cromatograma y gráfico de pureza de pico del patrón de clorhidrato de verapamilo. Los ángulos de pureza (PA) obtenidos para el pico de clorhidrato de verapamilo son para la primera fase PA=0,188; segunda fase PA= 0,046, tercera fase PA= 0,027 y cuarta fase PA= 0,019. El ángulo del umbral (TH) presentó un valor alrededor de 0,350. Estos resultados indican que no existen dife-

rencias espectrales significativas, ya que todos los ángulos de pureza son menores que el ángulo del umbral, concluyéndose que el pico estudiado corresponde al clorhidrato de verapamilo.

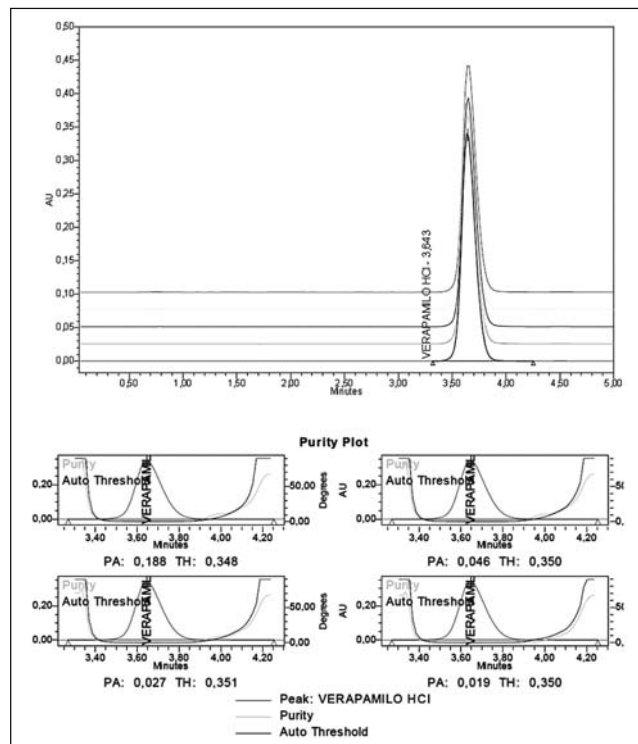


Figura 5. Cromatograma y gráfico de pureza del pico de patrón de clorhidrato de verapamilo para el estudio de la especificidad.

DEGRADACIÓN FORZADA

La segunda prueba de especificidad se realizó sometiendo la muestra a pruebas de degradación forzada. Se estudiaron los gráficos de pureza de pico cromatográfico de patrón y muestra control. La figura 5 muestra el gráfico de pureza de pico cromatográfico correspondiente al patrón de clorhidrato de verapamilo; allí se puede observar que el valor de ángulo de pureza (PA) es igual a 0,188, dicho valor es menor que el ángulo del umbral (TH= 0,348). Esta será la referencia para poder interpretar los gráficos de pureza de pico obtenidos en todas las pruebas de degradación forzada. La figura 6 muestra el gráfico de pureza del pico cromatográfico de clorhidrato de verapamilo en la muestra control. Al igual que en el caso del patrón control, se observa en la muestra control que el valor de PA= 0,178 es menor que TH=0,358 en el primer paso, este resultado evidencia que no existen interferencias en el pico cromatográfico de clorhidrato de verapamilo.

En la figura 7 se presentan los cromatogramas y en la tabla III los ángulos de pureza (PA) y ángulo del umbral (TH) correspondientes a las muestras sometidas a las pruebas de degradación forzada realizadas.

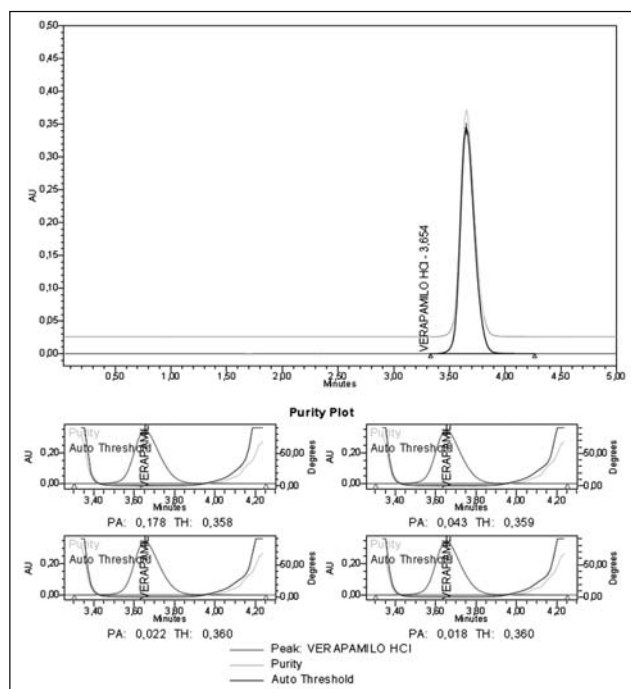


Figura 6. Cromatograma y gráfico de pureza del pico en la muestra de clorhidrato de verapamilo para el estudio de la especificidad.

En el cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida se observan tres nuevas señales que aparecen antes del pico correspondiente a clorhidrato de verapamilo. Ninguno de ellos se superpone con la señal de interés. Este hecho indica que la muestra se degrada con el ácido clorhídrico al 10%. Al estudiar el ángulo de pureza del pico de clorhidrato de verapamilo en la primera fase se observa que el valor de PA=0,288 está muy cercano a TH= 0,296. Este resultado indica que posiblemente esté presente algún tipo de interferencia dentro de la señal. En el cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica se puede apreciar la aparición de dos nuevas señales cromatográficas antes del pico de clorhidrato de verapamilo, pero ninguna de ellas se superpone con dicha señal. También se observó un ligero desplazamiento del tiempo de retención de 3,6 a 3,9 min. El análisis de pureza de pico indica que la señal corresponde a clorhidrato de verapamilo, ya que PA= 0,388 en la primera fase es menor a TH= 0,533. De la misma manera, el cromatograma de la muestra sometida a la exposición con peróxido de hidrógeno exhibe la señal correspondiente a clorhidrato de verapamilo, con dicha señal disminuida de tamaño; adicionalmente se observa la aparición de un pico intenso en 1,8 minutos y un pico de menor tamaño en 3,1 minutos y luego dos picos muy cercanos en 4,59 y 4,96 minutos. Algunas señales más pequeñas aparecen entre el primer pico y el correspondiente a clorhidrato de verapamilo. Este hecho indica que la muestra se degrada con peróxido de hidrógeno. Al

estudiar el ángulo de pureza del pico cromatográfico de clorhidrato de verapamilo en la primera fase se observa que el valor de PA=0,139 es menor que TH=0,275, lo cual evidencia que el pico estudiado corresponde igualmente al clorhidrato de verapamilo. Los cromatogramas de las muestras sometidas a radiación visible, calor a 90°C durante 4 horas y la muestra analizada siete días después de haber sido preparada mostraron un solo pico cromatográfico, en estos tres casos también se pudieron observar diferencias significativas entre el ángulo de pureza y el ángulo del umbral (Tabla III), estos hechos evidencian que existen diferencias espectrales, las cuales podrían atribuirse a un producto de degradación que esté coeluyendo con el analito. Los resultados de estas pruebas demuestran que el método desarrollado es un indicador de estabilidad.

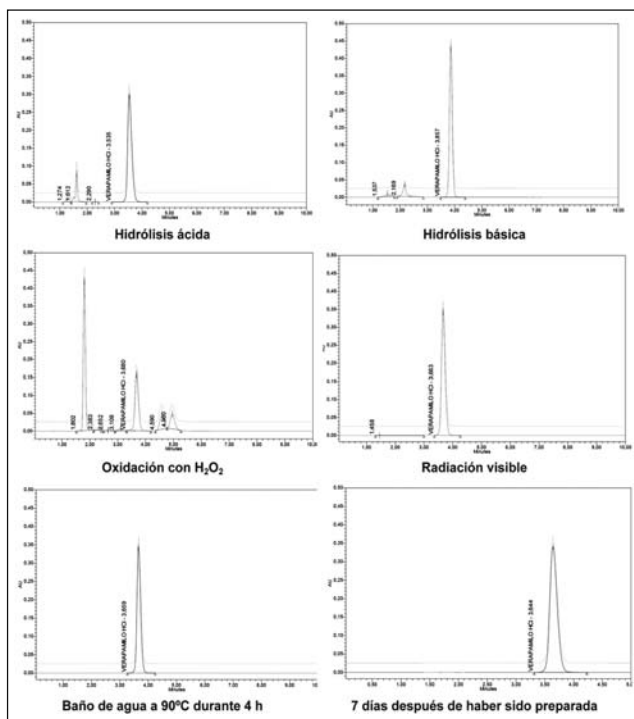


Figura 7. Cromatogramas correspondientes a las muestras sometidas a las diferentes pruebas de degradación forzada.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Los resultados para evaluar la precisión del sistema, basado en la variación del tiempo de retención y área para el clorhidrato de verapamilo en el patrón y la muestra, son presentados en la tabla IV. El coeficiente de variación fue menor o igual a 0,5% para el tiempo de retención y menor o igual a 1% para el área. El valor promedio de tiempo de retención para el patrón de clorhidrato de verapamilo fue de 3,6 minutos.

El valor promedio de tiempo de retención para el clorhidrato de verapamilo presente en la muestra fue

de 3,6 minutos. Los resultados muestran que el método es preciso ya que los valores de coeficiente de variación fueron menores a 2%.

Tabla III

Resultados del análisis de pureza del pico cromatográfico en las pruebas de degradación forzada realizadas

Condición de estrés	PA	TH
Hidrólisis ácida	0,288	0,296
Hidrólisis básica	0,388	0,533
Oxidación con peróxido de hidrógeno	0,139	0,275
Radiación visible por 7 días	0,448	0,341
90 °C durante 4 horas	0,394	0,343
7 días después de ser preparada	0,420	0,336

Nota: los valores sombreados indican las diferencias los casos donde PA>TH

PA = Ángulos de pureza TH = ángulo del umbral

Tabla IV

Precisión del sistema para el clorhidrato de verapamilo en el patrón y muestra bajo las condiciones seleccionadas

Inyección	Patrón		Muestra	
	t (min)	Área	t (min)	Área
1	3,6	3175832	3,6	3177218
2	3,6	3156541	3,6	3187327
3	3,6	3143852	3,6	3159695
4	3,6	3138998	3,6	3146223
5	3,6	318665288	3,6	3141533
6	3,6	3186701	3,6	3165837
Promedio	3,6	3161202	3,6	3162972
CV	0,5	1	0,4	1

CV: Coeficiente de Variación

REPETIBILIDAD

Los resultados para evaluar la repetibilidad del método analítico basado en la variación de la concentración de clorhidrato de verapamilo presente en la muestra se presentan en la tabla V. Las concentraciones de las muestras fueron calculadas utilizando la curva de calibración (figura 4). El promedio de las seis réplicas de la muestra fue de 79,5 mg/tab y su coeficiente de variación fue igual a 1,1%. Los resultados muestran la repetibilidad del método analítico, ya que el valor de coeficiente de variación fue menor a 2%.

Tabla V

Repetibilidad del método de la muestra de clorhidrato de verapamilo expresado como promedio y coeficiente de variación bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas

Muestra	Cantidad pesada de muestra $\pm 0,01$ (mg)	Cantidad de clorhidrato de verapamilo (mg/tab)	Promedio (mg/tab)
1	281,85	79,9	79,4
		78,8	
2	281,18	79,1	79,1
		79,1	
3	281,29	79,2	79,4
		79,7	
4	282,82	81,0	80,8
		81,0	
5	279,75	78,4	78,3
		78,2	
6	283,73	80,4	80,2
		80,1	
		Promedio	79,5
		S	0,9
		CV	1,1

S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Los resultados para evaluar la precisión intermedia basada en la concentración de clorhidrato de verapamilo presente en la muestra son presentados en la tabla VI. Las concentraciones de las muestras se calcularon utilizando las curvas de calibración (figura 4). El promedio fue de 78,7 mg/tab y su coeficiente de variación de 1,0%. El coeficiente de variación para una muestra de concentración mayor o igual a 0,1 mg/mL es igual a 3,7%. Los resultados obtenidos muestran que el método es preciso (Horwitz, 1982).

EXACTITUD

Los valores de exactitud, expresados en términos de porcentaje de recuperación, se presentan en la tabla VII. Los resultados para el clorhidrato de verapamilo en la muestra se encuentran dentro del rango comprendido entre 97,5 a 103,0% y los coeficientes de variación oscilan entre 1,6% y 2,9%. El método demostró ser exacto, ya que los límites de porcentaje de recuperación exigidos según AOAC son de 90 a 107%.

ROBUSTEZ

El empleo del diseño de la matriz de Plackett y Burman (1946) permitió estudiar el efecto que tienen

Tabla VI

Precisión intermedia del método analítico para el clorhidrato de verapamilo presente en la muestra

Inyección	día 1		día 2		día 3	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
1	78,9	79,4	76,1	77,5	78,8	79,5
2	79,2	78,6	75,8	78,6	78,4	79,4
3	79,6	78,6	76,6	78,0	78,9	80,1
4	79,7	79,6	76,2	78,7	78,6	79,7
5	79,3	80,3	76,0	78,7	79,0	79,9
6	80,4	80,6	76,0	78,7	79,1	79,6
Promedios	79,5	79,5	76,1	78,3	78,8	79,7
S	0,5	0,9	0,3	0,5	0,2	0,3
CV	0,7	1,1	0,3	0,6	0,3	0,3
		día 1	día 2	día 3		
Promedio		79,52	77,2	79,2		
S		0,01	1,6	0,7		
CV		0,01	2,0	0,8		

S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de Variación.

las variables seleccionadas: flujo, pH y proporción de acetonitrilo en la fase móvil (Tabla VIII). Para reconocer si las variables tienen influencia significativa sobre el resultado, se compara la diferencia obtenida para el cambio efectuado sobre ese parámetro y el producto de la desviación estándar y la raíz de 2 (Quattrochi y col., 1992):

$$\text{Si } |V_B| > s \sqrt{2} \Rightarrow \text{diferencia significativa}$$

Tabla VII

Resultados de la exactitud de clorhidrato de verapamilo en términos de porcentaje de recuperación

%	Muestra	% recuperación	Promedio	CV
80	1-1	99,8	97,4	2,9
	1-2	94,2		
	1-3	98,3		
100	2-1	97,3	98,9	1,6
	2-2	99,0		
	2-3	100,4		
120	3-1	105,4	103,0	2,3
	3-2	103,1		
	3-3	100,6		

CV: Coeficiente de Variación.

El diseño de la matriz según el modelo de Plackett y Burman (1946) se muestra en la Tabla IX.

Tabla VIII

Factores seleccionados para la evaluación de la robustez del método analítico para el clorhidrato de verapamilo bajo las condiciones seleccionadas

Factor		Niveles	
		-	+
Flujo (mL/min)	A	1,3	1,7
pH	B	5,1	5,5
% de acetonitrilo	C	53	57

Tabla IX

Diseño de la matriz según el modelo de Plackett y Burman (1946) la evaluación de la robustez del método bajo las condiciones seleccionadas

Experimento	A	B	C
1	1,3	5,1	53
2	1,3	5,5	53
3	1,3	5,1	57
4	1,3	5,5	57
5	1,7	5,1	53
6	1,7	5,5	53
7	1,7	5,1	57
8	1,7	5,5	57

A = Flujo de la fase móvil

B = pH

C = porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil

En la tabla X se reportan los resultados de la influencia de las variables estudiadas, las cuales presentan valores por debajo de $sv/2$ (0,53), por lo tanto se concluye que el método es robusto bajo las condiciones estudiadas.

Tabla X

Interpretación de los resultados para el estudio de la robustez del método bajo las condiciones seleccionadas

Factor	Influencia	Resultado
A	-0,37	Conforme
B	0,50	Conforme
C	-0,06	Conforme
AB	-0,16	Conforme
AC	-0,52	Conforme
BC	0,28	Conforme
ABC	-0,01	Conforme

A = Flujo de la fase móvil

B = pH

C = porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil

Conclusiones

Se desarrolló y validó una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de diodos para la cuantificación del clorhidrato de verapamilo. En la metodología analítica se evaluó la composición de diversas fases móviles, encontrándose que los mejores resultados se obtuvieron con la fase móvil conteniendo fosfato monobásico de amonio 0,05 M y acetonitrilo (58:42) a pH= 5,3, volumen de inyección: 10 μ L, flujo de 1,5 mL/min y una longitud de onda de 280 nm, empleando una columna cromatográfica de fase inversa μ bondapak C-18 (L1), 3,9x300 mm, 10 μ m, 125 Å.

La especificidad fue evaluada mediante los estudios de pureza de pico cromatográfico y de degradación forzada. Las muestras en las que se observó mayor degradación fueron aquellas donde se sometió a las mismas con peróxido de hidrógeno, a hidrólisis ácida e hidrólisis básica. El uso del detector de diodos permitió realizar el análisis de pureza de pico en las pruebas de degradación forzada; se encontraron diferencias espectrales en la primera fase para las muestras sometidas a calor, luz y radiación visible durante siete días, diferencias que pueden atribuirse a la presencia de productos de degradación. Estos resultados pueden ser utilizados para pruebas de indicadores de estabilidad. La sensibilidad del método se determinó en términos de límite de detección de 0,005 mg/mL y límite de cuantificación de 0,01 mg/mL.

La linealidad se cumplió en los rangos de concentración de 0,064 a 0,510 mg/mL con un coeficiente de correlación mayor de 0,999. Los resultados de coeficientes de variación para la precisión del sistema fueron menor o igual a 0,5% para el tiempo de retención y de 0,6% para el área, la repetibilidad y la precisión intermedia presentaron coeficientes de variación de 1,1% y 1,0%, respectivamente. Estos resultados demuestran que el método es preciso, ya que el criterio de aceptación debe ser igual o menor al 2%. Los resultados de exactitud reportados como porcentaje de recuperación se encuentran entre 97,5 y 103,0%, los coeficientes de variación oscilan entre 1,6 a 2,9%. El método demostró ser exacto, ya que los límites de porcentaje de recuperación exigidos según AOAC son de 90 a 107%. La robustez del método fue demostrada según el diseño de matriz de Plackett y Burman (1946), siendo robusto bajo las condiciones de pH= 5,3 \pm 0,2; flujo 1,5 \pm 0,2 mL/min y porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil= 55 \pm 2%. Los resultados obtenidos con el método analítico propuesto para la evaluación de tabletas recubiertas de clorhidrato de verapamilo 80 mg permiten cuanti-

ficar el fármaco. El método propuesto puede ser utilizado en análisis de rutina y pruebas de control de calidad, gracias a su rapidez, precisión, exactitud y reproducibilidad.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, UCV a través del proyecto I.I.F. 11-2011 y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico UCV (CDCH-UCV) a través del proyecto PI-06-8305-2011/1.

Referencias bibliográficas

- Abernethy D, Schwartz J. 1999. Calcium-antagonist drugs. *New Engl J Med* 341: 1447-1457.
- Ceccato A, Hubert P, Chiap P, Bechet I, Sibenaler-Dechamps R, Maes P, Crommen J. 1992. Determination of verapamil and norverapamil in human plasma by liquid chromatography: comparison between a liquid-liquid extraction procedure and an automated liquid-solid extraction method for sample preparation. *J Pharm Biomed Anal* 10: 937-942.
- García M, Aramayona J, Bregante M, Fraile L, Solans C. 1997. Simultaneous determination of verapamil and norverapamil in biological samples by high-performance liquid-chromatography using ultraviolet detection. *J Chrom B: Biomedical Sciences and Applications* 693(2): 377-382.
- Hofmann U, Von Richter O, Eichelbaum M, Schönberger F. 2000. Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, ($^2\text{H}_7$) verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chrom B: Biomedical Sciences and Applications* 738(1): 137-147.
- Horwitz W. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal Chem* 54(1): 67A-74A.
- Ivanova V, Zendelovska D, Stefova M, Stafilov T. 2008. HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction. *J Biochem Biophys Meth* 70(6): 1297-1303.
- Katzung, Bertram G. (2007). 12. Vasodilators & the Treatment of Angina Pectoris *Basic & Clinical Pharmacology* (9 edición). McGraw-Hill. pp. 274-277
- Plackett RL, Burman JP. 1946. *Biometrika*. 33:305.
- Quattrochi O, Abelaira S, Laba F. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Artes gráficas Farro. Buenos Aires, 1992. pp. 301-327.
- The United States Pharmacopeia USP 35. The United States Pharmacopeia Convention. Philadelphia, 2012. pp. 877-882.
- Valvo L, Alimenti R, Alimonti S, Raimondi S, Foglietta F, Campana F. 1997. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of related substances in verapamil hydrochloride. *J Pharm Biomed Anal* 15: 989-996.

Expresión de marcadores inflamatorios y de diabetes en una población venezolana con sobrepeso

Expression of inflammatory and diabetic markers in a Venezuelan population with overweight

MARÍA DEL ROSARIO GARRIDO¹, YAIRA MATHISON^{1,2}, EDUARDO ROMERO²,
MARIELLA PASTORELLO, MARÍA GABRIELA MATOS¹, ELSA CAMACHO¹, LETICIA FIGUEIRA¹,
JESÚS HERNÁNDEZ⁴, ELODIE BILLET¹, YUBIZALI LÓPEZ³, ANITA ISRAEL¹

Resumen

La obesidad es una epidemia que afecta tanto a los países ricos como a los pobres. La obesidad y el sobrepeso son los principales contribuyentes mundiales de enfermedades crónicas como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Hay evidencia que muestra que la inflamación es un mediador importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina inducida por la obesidad. Se evaluó la expresión periférica de marcadores inflamatorios y de diabetes en una muestra seleccionada de la población venezolana y su correlación con los parámetros de obesidad y el sobrepeso. 178 individuos, hombres y mujeres, con edades comprendidas entre 19 y 68 años, fueron divididos en 3 grupos de acuerdo con el índice de masa corporal (IMC): Normal (N): IMC<25Kg/m², obesidad grado 1 (OB1) con IMC entre 25 y 30 Kg/m² y obesidad grado 2 (OB2): IMC>30 Kg/m². Se determinaron los valores de los parámetros antropométricos, la glicemia, el perfil lipídico y la proteína C-reactiva (PCRus) plasmática. Además se determinó la albúmina y creatinina urinaria. Se determinó la concentración plasmática de interleucinas, quimiocinas y adipocinas mediante el método multiplex Bio-Plex™Pro. Se observaron incrementos en edad, peso, IMC, circunferencia abdominal (CA), porcentaje de grasa y triglicéridos en los sujetos de los grupos de OB1 y OB2 al compararlos con los normales. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en cuanto a la talla, glicemia, HDLc y el colesterol total. La proteína C-reactiva (PCRus) mostró incrementos significativos entre OB2 y N. Los niveles plasmáticos de insulina y péptido C fueron significativamente mayores en el grupo OB2 en comparación con N (p<0,01 y p<0,001). Los niveles plasmáticos de leptina y PAI-1 tendieron a un incremento y se observó una reducción significativa de la IL-15, RANTES y la grelina en los pacientes del grupo OB2 en comparación con N (p<0,01 y p<0,001). Se encontró correlación positiva entre el IMC con la peso, CA, insulina, péptido C, leptina, PAI-1 y la resistina. Nuestros hallazgos sugieren que en una muestra seleccionada de la población venezolana, el sobrepeso y la obesidad puede afectar biomarcadores inflamatorios y de diabetes, la presión arterial y el metabolismo de los lípidos con riesgo a desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: Obesidad, biomarcadores, bioplex, inflamación, diabetes.

Abstract

Obesity is an epidemic problem affecting rich and poor countries. Obesity and overweight are major contributors to the global burden of chronic diseases including diabetes, cardiovascular diseases and cancer. There is evidence showing that inflammation is an important mediator in the development of obesity-induced insulin resistance. We assessed the peripheral expression of inflammatory and diabetes markers in a selected sample of Venezuelan population and their correlation with parameters of obesity and overweight. 178 individuals, male and females, aged between 19 and 68 years old, were divided into 3 groups according with BMI: Normal weigh (N): BMI<25Kg/m², grade 1 obesity (OB1): BMI between 25 and 30 Kg/m², and grade 2 obesity (OB2): BMI>30 Kg/m². Values for anthropometric parameters, glycaemia, lipid profile and C-reactive protein (CRP) were determined. In addition urinary albumin and creatinine was assessed. The peripheral expression of circulating interleukins, chimiokynes and adipokines were evaluated with Bio-Plex Pro™, a magnetic bead-based multiplex assay. An increase in age, weight, BMI, and waist

¹ Laboratorio de Neuropéptidos, Facultad de Farmacia. ²Cátedra de Farmacología y Medicina Clínica A, Escuela JM Vargas. ³Servicio de Medicina 3, Hospital JM Vargas. ⁴Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela. Email: mrgarrido11@hotmail.com

circumference (WC), fat percentage and triglycerides was observed in patients of Groups OB1 and OB2 compared to N. There was no statistical difference between groups regarding height, glycaemia, HDLc and total cholesterol. Parameters such as hsCRP showed statistical differences between OB2 and N. The plasmatic levels of insulin and C-peptide, were significantly higher in OB2 group when compared with N ($p < 0.01$ y $p < 0.001$). Higher levels of leptin and PAI-1 tended to increase while a significant reduction of IL-15, RANTES and ghrelin were found in patients of OB2 group compared with N ($p < 0.01$ y $p < 0.001$). There was a significant correlation between BMI with weight, WC, insulin, C-peptide, leptin, PAI-1 and resistin. Our results suggest that overweight and obesity in a selected sample of venezuelan population can affect inflammatory and diabetes biomarkers, blood pressure and lipid metabolism with risk of developing diabetes and cardiovascular diseases.

Key words: Obesity, biomarkers, bioplex, inflammation, diabetes.

Introducción

En años recientes se ha observado un incremento sostenido en los niveles de sobrepeso a nivel mundial y el número de personas obesas ha alcanzado proporciones epidémicas (Finucane y col., 2011). La Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad (IASO por sus siglas en inglés) está llamando la atención sobre la necesidad de disminuir los altos niveles de obesidad en todos los países del mundo, ya que la prevalencia mundial se ha duplicado entre los años 1980 y 2008 (World Health Statistics, 2012; Global Health Observatory, 2013). En los Estados Unidos de América, entre 2009 y 2010, la tasa de obesidad fue de 37% en adultos y 17% en niños (Ogden y col., 2012). En el Reino Unido a su vez, la tasa de obesos se ha incrementado en un 30% en mujeres, 40% en hombres y 50% en niños para el 2007 con un pronóstico de 50% para el 2050 (Zeyda y Stulnig, 2009).

Una revisión de la literatura indica que la obesidad induce la mayoría de las patologías metabólicas tales como diabetes, enfermedad cardiovascular, hipertensión e hígado graso (Eckel, 2005) las cuales disminuyen la expectativa de vida de la población. Más aún, la evidencia creciente relaciona a la obesidad con una lista creciente de patologías incluyendo desórdenes respiratorios, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, todo lo cual contribuye con la morbilidad y mortalidad asociada a la obesidad y los costos médicos que esto representa (Finkelstein y col., 2009; Flegal y col., 2013).

Las causas que subyacen en esta epidemia de obesidad no están claramente definidas; es importante definir la población que está en riesgo de desarrollar las complicaciones relacionadas directamente con la obesidad y establecer marcadores sensibles y específicos que contribuyan en el diagnóstico y monitoreo clínico, así como determinar nuevos factores de riesgo metabólicos.

La medida antropométrica más frecuente para

determinar el peso relativo y clasificar la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC). Individuos con un $IMC < 25$ son clasificados como peso normal, individuos con un IMC entre 25 y 29,9 kg/m^2 tienen sobrepeso, mientras que aquellos que superan 30 kg/m^2 de IMC son clasificados como obesos (Orpana y col., 2009).

En los últimos años ha surgido evidencia creciente de que la obesidad está asociada con la inflamación sistémica, que a su vez está relacionada con la resistencia a la insulina y con el síndrome metabólico; este estatus está condicionado por la activación del sistema inmune innato en el tejido adiposo que promueve la producción y liberación de citocinas proinflamatorias que contribuyen a la producción de proteínas responsables de la respuesta de fase aguda (Faloia y col., 2011; Rodríguez-Hernández y col., 2013).

Las citocinas son mediadores inmunológicos cruciales en muchas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, y se ha involucrado a las mismas en la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en la obesidad, pudiendo por lo tanto ejercer un papel principal en el desarrollo de las patologías relacionadas con la obesidad. En pacientes obesos se ha demostrado la presencia de un nivel bajo de inflamación crónica, determinado por incrementos en la concentración plasmática de reactantes de fase aguda tales como la Proteína C-reactiva (PCRus), y de citocinas proinflamatorias las cuales regulan tanto positiva como negativamente el metabolismo lipídico y la glucosa sistémica, dando origen al concepto de inflamación metabólica, que está siendo ampliamente aceptado (Hotamisligil y col., 1996, 2006).

En Venezuela existen pocos estudios que correlacionan a la obesidad con marcadores periféricos de inflamación y diabetes. Es por ello que en el presente estudio se evaluó los niveles de marcadores inflamatorios y de diabetes, así como su correlación con parámetros de sobrepeso en una muestra seleccionada de la población de Venezuela.

Materiales y métodos

PACIENTES

Un grupo de 178 sujetos, de ambos géneros, seleccionados entre los que asisten voluntariamente a la consulta de Medicina Interna del Hospital Vargas de Caracas y a la consulta de la Unidad de Neuropeptidos de la Facultad de Farmacia, desde Julio de 2012 hasta Abril de 2013, con edades comprendidas entre 19 y 68 años de edad. Los sujetos fueron divididos en tres grupos según el Índice de Masa Corporal (IMC): peso normal (N): menor de 25 de IMC; obesidad grado 1 (OB1): IMC entre 25 y 29,9 y obesidad grado 2 (OB2): IMC superior a 30. Fueron excluidos del estudio sujetos con hábito tabáquico, proteinuria franca y/o diagnóstico previo de nefropatías, independientemente de su etiología, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, lupus eritematoso sistémico, mieloma múltiple o con PA superior a 160/ 100 mmHg.

Se aplicó una encuesta a los voluntarios indagando acerca de sus antecedentes médicos, personales, familiares y hábitos de vida. La selección buscó una distribución homogénea de individuos con condiciones socioeconómicas similares. A los grupos en estudio, se les comunicó acerca de las características e importancia del estudio y se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Los pacientes fueron sometidos a examen físico determinando talla, peso, circunferencia de cintura, porcentaje de grasa por bioimpedancia eléctrica con el medidor de grasa OMRON Modelo BHF306C y presión arterial efectuándose tres mediciones con un minuto de separación entre ellas, utilizando un equipo automatizado (Accutorr Plus, Datascope, New Jersey, USA). Las condiciones preanalíticas fueron las recomendadas mundialmente para este tipo de valoraciones: ayuno de 8-12 horas y sin dieta previa, evitando ejercicios extenuantes, estrés, entre otros. La muestra de sangre se obtuvo mediante venopunción directa en la región antecubital utilizando tubos con EDTA. Se obtuvo una muestra de orina para determinación de albúmina y creatinina. Antes de un período de dos horas, las muestras previamente mantenidas en frío, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y en el plasma se cuantificó la concentración plasmática de las citocinas, quimiocinas y perfil lipídico.

Todos los protocolos experimentales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario de Caracas y cumplen con la Declaración de Helsinki para experimentación con seres humanos (1964 y revisión del 2013).

MÉTODOS BIOQUÍMICOS

Todos los métodos fueron procedimientos estándar

utilizados en el laboratorio de la Unidad de Neuropeptidos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Para la medición de los parámetros clínicos, se recogieron muestras de sangre venosa después del ayuno nocturno. La glucosa, el colesterol total, el colesterol HDL y los triglicéridos, se determinaron por métodos enzimáticos Trinder (Stanbio) y las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro. La concentración de albúmina y creatinina en orina se determinó por método colorimétrico empleando un estucho comercial (Bio Systems). Se calculó la relación albúmina/creatinina (ACR). Se determinó la proteína C reactiva (PCRus), mediante Kit comercial NycoCard Reader II.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS, FACTORES DE CRECIMIENTO Y MARCADORES DE DIABETES

Las muestras se evaluaron por duplicado mediante el análisis multiplex de microesferas (Bio-Plex Pro Assays Cytokine, Chemokine and Growth Factors, Life Science Group, BIORAD). Brevemente, el sistema Bio-Plex® se basa en tres núcleos tecnológicos. El primero constituye una tecnología novedosa que emplea hasta 100 microesferas de poliestireno (5,6µm) o magnéticas (8µm), teñidas fluorescentemente y codificadas con un código espectral (Tecnología xMAP), con detección simultánea de hasta 100 moléculas diferentes por muestra. El segundo es un citómetro de flujo con dos rayos láser asociados a un sistema óptico que permite cuantificar las diferentes moléculas unidas a la superficie de las microesferas. El tercero está constituido por un procesador de señal digital de alta velocidad que maneja los datos de fluorescencia con alta eficiencia. Esta técnica nos permitió estudiar en forma simultánea las concentraciones plasmáticas de las interleucinas (IL)-1alfa/beta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL13, IL-15, IL-17, de las citocinas: eotaxina, factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón-gamma (INF-γ), proteína 10 inducible por INF-γ/ quimiocina 10 motivo C X C (IP-10/CXCL10), proteína quimiotáctica de monocitos tipo-1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa/beta (MIP-1a/b), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), ligando 5 de motivo C/ proteína expresada y secretada en células T normales reguladas en la activación (CCL5/RANTES), factor de necrosis tumoral - alfa (TNF-α) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Igualmente se determinaron marcadores de diabetes como: péptido-C, grelina, polipéptido inhibitor gástrico (GIP), péptido similar al glucagón tipo -1 (GLP-1), glucagón, insulina, leptina, inhibidor

del activador del plasminógeno-I (PAI-I), resistina, visfatina, adiponectina y adiposina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (E.E.M.). Se evaluó la distribución de los datos a través de la inspección visual y las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) con análisis *post-hoc* para comparar los grupos sujetos a estudio; y la correlación de Pearson para relacionar las variables sujetas a estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS

Las características clínicas de los tres grupos de pacientes se muestran en la Tabla I. La distribución en género de los pacientes fue de 85 mujeres (N=20; OB1=23 y OB2=42) y 93 hombres (N=32; OB1=24 y OB2=37). Se observó un incremento significativo en edad, peso, IMC, circunferencia abdominal (CA), porcentaje de grasa corporal, triglicéridos y presión arterial sistólica (PAS) en los pacientes de los Grupos OB1 y OB2 al compararlos con N ($p < 0,0001$). No se observaron diferencias significativas en talla, glicemia y colesterol total entre los tres grupos experimentales. Otros parámetros tales como PCRus, relación albumina/creatinina (ACR) y presión arterial diastólica (PAD) solo mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el tercer grupo (IMC>30) y el primero (IMC<25). Igualmente, se observó incrementos significativos en la PAD, en los pacientes del OB2 cuando se comparan con los del Grupo OB1.

NIVELES DE LAS CITOCINAS Y MARCADORES DE DIABETES PLASMÁTICOS EN LOS PACIENTES SUJETOS A ESTUDIO

El método de la microesferas multiplex permitió determinar la concentración plasmática de 27 citocinas y 12 marcadores de diabetes en los pacientes evaluados. En la Tabla II se muestran los niveles plasmáticos de algunas de las citocinas y marcadores de diabetes evaluados. Como puede observarse, los niveles plasmáticos de insulina y péptido C fueron significativamente mayores en los pacientes del grupo OB2 al compararlos con el Grupo N ($p < 0,01$ y $p < 0,001$). Se observó una tendencia a incremento de los niveles de leptina y PAI-I, que no alcanzaron significancia estadística. Por su parte, se observó una reducción significativa de los niveles de las IL-15, RANTES y grelina en los pacientes del grupo OB2 al compararlos con el Grupo N ($p < 0,01$ y $p < 0,001$). Los

valores plasmáticos de las otras citocinas y marcadores de diabetes no mostraron diferencias entre los grupos sujetos a estudio (no mostrados).

Tabla I

Parámetros clínicos de la población estudiada

Parámetro	Control (IMC<25)	IMC entre 25 y 30	IMC > 30
	N= 52	N=47	N=79
Género (F/M)	20/32	23/24	42/37
Edad (años)	32,0 \pm 1,8	39,5 \pm 2,1**	42,7 \pm 1,2****
Peso (kg)	60,0 \pm 1,4	74,2 \pm 1,3***	96,98 \pm 2,01****
Talla (cm)	1,7 \pm 0,01	1,7 \pm 0,01	1,7 \pm 0,01
IMC (Kg/m ²)	21,5 \pm 0,4	27,1 \pm 0,2***	35,2 \pm 0,6****
CA (cm)	79,4 \pm 1,1	91,3 \pm 1,0***	107,8 \pm 1,45****
% Grasa corporal	23,6 \pm 1,5	27,7 \pm 1,8*	34,6 \pm 1,5****
PAS (mmHg)	114,5 \pm 1,6	124,7 \pm 2***	129,4 \pm 1,6***
PAD (mmHg)	74,1 \pm 1,3	80,6 \pm 1,4	85,6 \pm 1,2#
Glicemia(mg/dl)	81,4 \pm 1,1	84,2 \pm 1,7	88,8 \pm 1,4***
Triglic (mg/dl)	88,7 \pm 7,3	135,3 \pm 14**	136,7 \pm 7,8***
HDLc (mg/dl)	43,0 \pm 1,6	42,0 \pm 1,7	37,9 \pm 1,1****
Col T (mg/dl)	157,1 \pm 5,7	168,4 \pm 7,9	164,8 \pm 6,6
PCRus (mg/L)	5,3 \pm 0,5	7,5 \pm 0,8	9,2 \pm 1,2*
ACR (mg/g)	14,6 \pm 1,6	15,5 \pm 2,2	21,9 \pm 1,2**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado con IMC<25; # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ comparado con IMC 25-30.

Tabla II

Niveles de citocinas y marcadores de diabetes plasmáticos en los pacientes sujetos a estudio

Parámetro	Control (IMC<25)	IMC entre 25 y 30	IMC > 30
	N= 52	N=47	N=79
IL-12	63 \pm 8	45 \pm 5	47 \pm 4
IL-15	83 \pm 8	74 \pm 10	59 \pm 5*
RANTES	99626 \pm 970	22119 \pm 9677***	9029 \pm 846***
PEPTIDE-C	497 \pm 37	607 \pm 37	674 \pm 43**
GHRELIN	812 \pm 92	668 \pm 74	541 \pm 52*
INSULIN	153 \pm 13	207 \pm 18	280 \pm 28***
LEPTIN	3519 \pm 552	4969 \pm 709	5054 \pm 537
PAI-I	6643 \pm 770	6448 \pm 501	8337,5 \pm 766

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado con IMC<25.

CORRELACIÓN DEL IMC CON LOS NIVELES DE CITOCINAS, MARCADORES DE DIABETES PLASMÁTICOS Y PARÁMETROS CLÍNICOS EN LOS PACIENTES SUJETOS A ESTUDIO

El análisis de Pearson de las correlaciones entre el IMC y las características clínicas de los sujetos y los

biomarcadores se muestra en la Tabla III. Como se puede observar el IMC presentó una correlación significativa con el peso, PAS, PAD, CA, péptido C, la insulina, leptina, PAI-1 y resistina. No hubo asociación significativa entre el IMC y el resto de los parámetros clínicos y biomarcadores evaluados.

Tabla III

Análisis de la correlación de Pearson entre IMC, niveles de citocinas y marcadores de diabetes plasmáticos y parámetros clínicos

	r	P
IMC & PESO	0,8519	0,0001
IMC & PAS	0,2229	0,01
IMC & PAD	0,3205	0,0003
IMC & CA	0,8518	0,0001
IMC & PEPTIDO-C	0,1854	0,055
IMC & INSULINA	0,4163	0,0001
IMC & LEPTINA	0,2838	0,0029
IMC & PAI-1	0,2240	0,0198
IMC & RESISTINA	0,2930	0,0021

Discusión

La epidemia del sobrepeso y la obesidad ha incrementado dramáticamente el número de individuos con anomalías metabólicas y enfermedades cardiovasculares prematuras. El sobrepeso y la obesidad, especialmente en casos de acumulación de la grasa abdominal, está asociada con un bajo grado de inflamación sistémica, el cual está caracterizado, entre otros factores, por un incremento en los niveles circulantes de citocinas (Solomon y Manson, 1997; Pi-Sunyer, 2004; van Greevenbroek y col., 2013).

Estudios recientes indican la existencia de una fuerte correlación entre el IMC y el diámetro de cintura, con biomarcadores relacionados con la inflamación; lo cual sugiere que el IMC o el CA representan predictores de riesgo del síndrome metabólico y patologías asociadas (Mojiminiyi y col., 2009).

En el presente trabajo estudiamos en una muestra seleccionada de la población venezolana, la posible relación entre la obesidad y sobrepeso (expresado con el IMC) con los biomarcadores de diabetes e inflamación, a fin de determinar la posible aplicación de esos biomarcadores como factores de riesgo asociados a las complicaciones clínicas vinculadas a esta patología en la población venezolana.

Coincidente con lo reportado en la literatura, nuestros resultados demuestran una asociación entre el incremento en el peso expresado como el IMC

con cambios desfavorables en el perfil lipídico, tales como un incremento triglicéridos y una relación inversa con el HDLc (Visser y col., 1999; Klisic y col., 2014).

La PCRus es un marcador de inflamación sistémica que ha sido implicado como factor de riesgo en enfermedades con riesgo cardiovascular, tales como la obesidad y la hipertensión. Del mismo modo, se ha reportado una fuerte asociación entre la PCRus y la resistencia a la insulina (Birgel y col., 2000). La resistencia a la insulina conduce a hiperglicemia e hiperlipidemia, que puede progresar a diabetes tipo 2. Nuestros resultados sugieren en la muestra seleccionada de la población venezolana estudiada, que el incremento en los valores de PCRus, podría estar asociado a un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, pues se observó un incremento de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, insulina y péptido C en los pacientes obesos con respecto a los normopeso, lo cual sugiere la existencia de un estado de inflamación sistémica y resistencia a la insulina en la obesidad (Ridker y col., 1998; Chiu y col., 2012; Klisic y col., 2014).

Como se ha mencionado, la obesidad es considerada un factor de riesgo para la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. La acumulación de grasa abdominal puede inducir inflamación por varios mecanismos, el exceso de ingesta calórica conlleva la expansión del tejido adiposo con hipertrofia de los adipocitos lo que genera a su vez señales que inducen el reclutamiento de macrófagos (Surmi y Hasty, 2008; Tourniaire y col., 2013).

La infiltración del tejido adiposo por los macrófagos está siendo investigada ampliamente, y diversos autores han reportado el papel de las quimiocinas CCL2/MCP-1, RANTES/CCL5 y CXCL14 en la infiltración del tejido adiposo por macrófagos y en la patogénesis de la resistencia a la insulina; demostrándose que varias de estas quimiocinas están incrementadas en el tejido adiposo del obeso, confirmándose la presencia de un estado inflamatorio (Nara y col., 2007; Keophiphath y col., 2009; Chavey y col., 2009). Contrario a lo reportado en la literatura acerca de la incrementada concentración y expresión del RANTES/CCL5 tanto circulante como en el tejido adiposo en el obeso (Wu y col., 2007; Baturcam y col., 2014), nuestros resultados indican que en la muestra seleccionada de la población evaluada, existe una disminución significativa de la quimiocina RANTES/CCL5 circulante en los pacientes obesos con respecto a los normopeso. Estos hallazgos son coincidentes con los de Škopková y col. (2007), quienes reportan mediante la técnica de matriz de proteínas (*protein array*) una disminución de la quimiocina RANTES en

el tejido adiposo subcutáneo del obeso. La diversidad de infiltración de los macrófagos según la distribución del tejido adiposo pudiera explicar estas discrepancias.

Recientemente se ha sugerido a la grasa visceral como un tejido metabólicamente activo; presenta asimismo, una estrecha relación con una mayor producción de mediadores inflamatorios tales como PCRus, TNF- α , IL-6, y el Inhibidor-1 del activador del plasminógeno (*plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) por sus siglas en inglés), relacionados con síndromes tales como el síndrome metabólico, resistencia a insulina y enfermedades cardiovasculares (Dandona y col., 2004).

Al igual que lo reportado por Škopková y col. (2007), nuestro estudio no mostró diferencias significativas entre los grupos estudiados, en los niveles de TNF- α e IL-6, dos de las principales citocinas mediadoras de la respuesta inflamatoria e inmune. Estos mediadores de la inflamación se encuentran generalmente elevados en la obesidad, habiéndose demostrado una asociación positiva entre ellos y el IMC. Sin embargo, dentro de un rango estrecho de IMC, los individuos pueden variar de modo significativo en cuanto a la resistencia a la insulina, y estas diferencias inter individuales han sido atribuidas a diferencias en la distribución de la grasa corporal, siendo más relevante la grasa central o abdominal (van Greevenbroek y col., 2013).

Más aún, el organismo activa mecanismos implicados en la atenuación de los efectos deletéreos del TNF- α . Uno de esos mecanismos puede involucrar a la IL-15, la cual ha mostrado efectos sobre el metabolismo intermediario, regulando los niveles de glucosa y lípidos y disminuyendo la proteólisis en el músculo estriado. Esto sugiere que la inducción de la producción de la IL-15 endógena es un mecanismo compensatorio, e incluso inhibitorio sobre los efectos negativos en pacientes con obesidad o diabetes tipo II, en los cuales está presente esta condición de baja inflamación (Sánchez-Jiménez y Alvarado-Vásquez, 2013).

En el presente trabajo, encontramos una correlación débil entre el IMC con la resistina, PAI-1 y leptina, y negativa con la grelina. La leptina es considerada como el eslabón entre la obesidad y la diabetes, ya que ha sido demostrado que controla la glicemia vía el control del apetito y almacenamiento de grasa (Bastard y col., 2006). Estudios recientes muestran que los niveles de leptina están incrementados en sujetos obesos en comparación con no obesos (Suzuki y col., 2003; Conroy y col., 2011). Nuestros resultados apoyan esos resultados y los obtenidos por Petrášová y col. (2014). Aunque la leptina actúa prin-

cipalmente a nivel del Sistema Nervioso Central, existe una relación entre los niveles de leptina y la inflamación de bajo grado asociada a la obesidad, sugiriendo que la leptina podría ejercer acciones periféricas en virtud de su estructura como citocina (Ahima y Flier, 2000). La leptina es conocida como un inductor del TNF- α , lo que sugiere un papel en la inflamación y resistencia a la insulina (Uysal y col., 1997).

Asimismo, diversos estudios epidemiológicos han vinculado niveles elevados de resistina con un riesgo incrementado de diabetes tipo 2, infarto de miocardio y aterosclerosis (Burnett y col., 2006; Chen y col., 2009). Esos resultados y los presentados en nuestro estudio, apoyan la idea de que los niveles de resistina podrían servir como un marcador de enfermedad metabólica en el humano.

El PAI-1 es una serpina que actúa como el principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno y por lo tanto, de la fibrinólisis. Se ha descrito que el PAI-1 se encuentra elevado en varias enfermedades y su síntesis está aumentada en proporción directa a la cantidad de tejido adiposo e insulinemia; esto genera un estado de hipofibrinólisis e hipercoagulabilidad, y contribuye al mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que caracteriza al paciente obeso. Nuestros resultados demostraron una asociación débil positiva entre el IMC con el PAI-1 en los pacientes sujetos a estudio; lo cual está en concordancia con los resultados de Pérez y col., (2014) quienes reportan en una población de Puerto Rico, que pacientes con resistencia a la insulina y diabetes mellitus, presentaron un perfil de riesgo cardiovascular mayor que pacientes normoglicémicos, caracterizados por una mayor prevalencia de obesidad, bajo HDLc, hipertensión, aumento de triglicéridos y PAI-1. Por lo tanto, se sugiere que el PAI-1 podría constituir un marcador de riesgo metabólico en nuestra población de estudio.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la obesidad y el sobrepeso observada en una muestra seleccionada de la población venezolana puede afectar la presión arterial, el metabolismo lipídico, marcadores de inflamación y diabetes con riesgo a desarrollo a enfermedades cardiovasculares y diabetes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Banni Caraballo por su asistencia técnica. Este estudio fue subvencionado por el Ministerio del Poder Popular de Ciencia Tecnología e Industrias, Proyecto Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV No. 2007001585 y PEI-2012000993 y 20122000760. CDCH: PG-06-8353-2011-1 PG-8345-2011-1.

Referencias bibliográficas

- Ahima RS, Flier JS. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-37.
- Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H. 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17(1):4-12.
- Baturcam E, Abubaker J, Tiss A, Abu-Farha M, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, Cherian P, Elkum N, Hammad M, John J, Kavalakatt S, Lehe C, Warsame S, Behbehani K, Dermime S, Dehbi M. 2014. Physical exercise reduces the expression of RANTES and its CCR5 receptor in the adipose tissue of obese humans. *Mediators Inflamm* 2014:627150.
- Birgel M, Gottschling-Zeller H, Rohrig K, Hauner H. 2000. Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1682-1687.
- Burnett MS, Devaney JM, Adenika RJ, Lindsay R, Howard BV. 2006. Cross-sectional associations of resistin, coronary heart disease, and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 91:64-68.
- Chavey C, Lazennec G, Lagarrigue S, Clape C, Iankova I, Teyssier J, Annicotte JS, Schmidt J, Matakis C, Yamamoto H, Sanches R, Guma A, Stich V, Vitkova M, Jardin-Watelet B, Renard E, Strieter R, Tuthill A, Hotamisligil GS, Vidal-Puig A, Zorzano A, Langin D, Fajas L. 2009. CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab* 9: 339-349.
- Chen BH, Song Y, Ding EL, Roberts CK, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Gaziano JM, Liu S. 2009. Circulating levels of resistin and risk of type 2 diabetes in men and women: results from two prospective cohorts. *Diabetes Care* 32:329-334.
- Chiu FH, Chuang CH, Li WC, Weng YM, Fann WC, Lo HY, Sun Ch, Wang SH. 2012. The association of leptin and C-reactive protein with the cardiovascular risk factors and metabolic syndrome score in Taiwanese adults. *Cardiovasc Diabetol* 25:11-40.
- Conroy SM, Chai W, Lim U, Franke AA, Cooney RV, Maskarinec G. 2011. Leptin, adiponectin, and obesity among Caucasian and Asian women. *Mediators Inflamm* 2011: 253580.
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. 2004. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25:4-7.
- Eckel RH. 2005. Obesity. *Circulation* 111(15):e257-e259.
- Faloia E, Michetti G, de Robertis M, Luconi MP, Furlani G, Boscaro M. 2012. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *J Nutrition Metab* 2012: 476380.
- Finkelstein EA, Trogdon JG, Cohen JW, Dietz W. 2009. Annual medical spending attributable to obesity: payer- and service-specific estimates. *Health Aff (Millwood)*, 28(5):w822-w831.
- Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutiérrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M; Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Body Mass Index). 2011. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377: 557-567.
- Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. 2013. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 309(1):71-82.
- Global Health Observatory (GHO). 2013. Obesity 2008. World Health Organization. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/index.html.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271(5249): 665-668.
- Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444(7121):860-867.
- Keophiphath M, Rouault C, Divoux A, Clement K, Lacasa D. 2009. CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 39-45.
- Kliscic AN, Vasiljevic ND, Simic TP, MD, Djukic TI, Milos Z, Maksimovic MZ, Marija G, Matic MG. 2014. Association between C-Reactive Protein, anthropometric and lipid parameters among healthy normal weight and overweight postmenopausal women in Montenegro. *Lab Medicine* 45(1): 12-16.
- Mojiminiyi O, Al Mulla F, Abdella NA. 2009. Which obesity index best explains the link between adipokines, coronary heart disease risk and metabolic abnormalities in type 2 diabetes mellitus? *Med Princ Pract* 8:23-29.
- Nara N, Nakayama Y, Okamoto S, Tamura H, Kiyono M, Muraoka M, Tanaka K, Taya C, Shitara H, Ishii R, Yonekawa H, Minokoshi Y, Hara T. 2007. Disruption of CXC motif chemokine ligand-14 in mice ameliorates obesity induced insulin resistance. *J Biol Chem* 282: 30794-30803.
- Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. 2012. Prevalence of obesity in the United States, 2009-2010. *NCHS data brief* 2012, 82:1-8.
- Orpana HM, Berthelot JM, Kaplan MS, Feeny DH, McFarland B, Ross NA. 2009. BMI and mortality: results from a national longitudinal study of Canadian adults. *Obesity* 18(1):214-218.
- Pérez CM, Soto-Salgado M, Suárez E, Guzmán M, Ortiz AP. 2014. High prevalence of diabetes and prediabetes and their coexistence with cardiovascular risk factors in a Hispanic community. *J Immigr Minor Health* (epub).
- Petrášová D, Bertková I, Petrášová M, Hájová E, Mareková M, Babinská I, Jarčuška P, Pella D, Madarasová A, Gecková, HepaMeta Team. 2014. Biomarkers associated with obesity and overweight in the Roma population residing in eastern Slovakia. *Cent Eur J Public Health, Supplement* 22:S18-S21.
- Pi-Sunyer FX. 2004. The epidemiology of central fat distribution in relation to disease. *Nutr Rev* 62:S120-126.
- Ridker PD, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. 1998. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 98(8):731-733.

- Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. 2013. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Internat J Endocrinol* 2013:67859.
- Sánchez-Jiménez R, Alvarado-Vásquez N. 2013. IL-15 is a regulator of TNF- α in patients with diabetes mellitus type 2. *Med Hypotheses* 80(6):776-777.
- Škopková M, Penesová A, Sell H, Rádiková Z, Vlček M, Imrich R, Koška J, Ukropec J, Eckel J, Klimeš I, Gašperíková D. 2007. Protein array reveals differentially expressed proteins in subcutaneous adipose tissue in obesity. *Obesity* 15: 2396–2406.
- Solomon CG, Manson JE. 1997. Obesity and mortality: a review of the epidemiologic data. *Am J Clin Nutr* 66 (4 Suppl):1044S–1050S.
- Surmi BK, Hasty AH. 2008. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 3: 545-556.
- Suzuki K, Ito Y, Ochiai J, Kusuhara Y, Hashimoto S, Tokudome S, Kojima M, Wakai K, Toyoshima H, Tamakoshi K, Watanabe Y, Hayakawa N, Maruta M, Watanabe M, Kato K, Ohta Y, Tamakoshi A: JACC Study Group. 2003. Relationship between obesity and serum markers of oxidative stress and inflammation in Japanese. *Asian Pac J Cancer Prev* 4(3):259-266.
- Tourniaire F, Romier-Crouzet B, Lee JH, Marcotorchino J, Gouranton E, Salles J, Malezet Ch, Astier J, Darmon P, Blouin E, Walrand S, Ye J, Landrier JF. 2013. Chemokine expression in inflamed adipose tissue is mainly mediated by NF- κ B. *PLoS ONE* 8(6): e66515.
- Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase/peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path* 22 (2): 158–161.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. 1997. Protection from obesity induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389: 610–614.
- van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. 2013. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med* 71(4):174-187.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. 1999. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282:2131-2135.
- World Health Statistics. 2012. World Health Organization. WHO Press, Switzerland.
- Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, García GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM. 2007. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115(8): 1029–1038.
- Zeyda M, Stulnig TM. 2009. Obesity, inflammation, and insulin resistance: a mini-review. *Gerontology* 55(4): 379-386.

Cosméticos ecológicos.

Estudio del comportamiento reológico

Organics cosmetics. Rheological behavior study

GORETTI DE LA C. RODRÍGUEZ DE SOUSA^{1*}, LUISA CAROLINA BUCARITO KEPP¹,
MARÍA ESTHER VIEIRA VIEIRA¹, ISABEL ANDUEZA DE POPOLI¹

Resumen

En los últimos años se ha incrementado el número de organizaciones dedicadas a controlar la fabricación y comercialización de los cosméticos ecológicos; sin embargo, Venezuela apenas está comenzando a tomar conciencia de la importancia que esto representa para las generaciones futuras, es por ello que se desarrolló un champú y un acondicionador ecológico. El criterio de selección de los productos se basó en la alta frecuencia de uso y en el riesgo que generan estos sobre el ecosistema. Para la formulación se siguieron las pautas establecidas por los organismos certificadores internacionales. Asimismo, se evaluó su comportamiento reológico y viscosidad, empleando un Reómetro de cono y plato Brookfield RVDV-III Ultra, aguja CPE-51, a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, comparándose con un champú y un acondicionador convencional. Los productos mostraron un comportamiento pseudoplástico, lo cual facilita su aplicación, ya que al ejercer una fuerza de deformación las moléculas se alinean presentando menor resistencia a fluir. La viscosidad del champú ecológico fue menor a la del convencional, lo que permite percibirlo como un producto ligero, incapaz de producir daño al entorno. Por el contrario, la viscosidad del acondicionador orgánico fue mayor a la del convencional, lo que favorece su capacidad acondicionadora en el cabello. Todos los productos, a excepción del champú convencional, presentaron un comportamiento ligeramente tixotrópico, característica particularmente deseada en los acondicionadores, ya que favorece su estabilidad. Es posible elaborar en Venezuela cosméticos ecológicos con características similares a los cosméticos convencionales, con puntos de diferencia favorables; más naturales y menos perjudiciales al ambiente.

Palabras claves: Champú, acondicionador, ecológico, comportamiento reológico, viscosidad.

Abstract

In recent years the cosmetic area has increased the number organizations dedicated to control the manufacture and marketing of organic cosmetics, however, Venezuela is just beginning to realize how important this is for future generations, which is why an ecological shampoo and conditioner are developed in this work. The products selection was made based on the use frequency and the risk they generate on the environment. For the formulation we have followed the established guidelines by international organic certification. Also, the rheological behavior and viscosity was evaluated using a cone and plate rheometer RVDV-III Ultra Brookfield, CPE-51 needle at 26°C and was compared with a conventional shampoo and conditioner. Both, shampoos and conditioners, showed pseudoplastic behavior, because in applying a biasing force, the molecules are able to align presenting less resistance to flow, which facilitates its application. The viscosity of the organic shampoo was lower than the conventional, this would categorize the shampoo as a light, unable to produce damage to the environment. The viscosity of organic conditioner was higher than the conventional one, which enhances their ability of conditioner the hair. All products except traditional shampoo, presented a slightly thixotropic behavior, particularly desired feature in conditioners because it promotes stability. It is possible to develop organic cosmetics in Venezuela with similar characteristics to conventional cosmetics, with favorable differences; more natural and less harmful to the environment.

Key words: Shampoo, conditioner, organic, rheological behavior, viscosity.

Introducción

El crecimiento económico tanto de los países desarrollados como en vía de desarrollo, ha producido consecuencias nefastas para el ambiente. En los últimos 50 años se ha introducido al mercado mundial

una gran cantidad de compuestos sintéticos cuyo impacto sobre el ecosistema, en muchos casos, es desconocido (Lara y col., 2008).

No sólo la industria química genera desechos y por ende contaminación ambiental. En los Estados

¹ Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización.

* E-mail: goretitrod@hotmail.com

Unidos existen estudios en donde se ha encontrado en ríos, lagos y mares, agentes contaminantes del ambiente provenientes de productos para el cuidado y la higiene personal, como los agentes surfactantes; estos son capaces de disminuir la tensión superficial del agua, favoreciendo la formación de espuma, y afectando la libre transferencia de oxígeno entre el agua y el aire, siendo esto perjudicial para la flora y la fauna que allí habita (Saouter y col., 2001). Además, el contenido de fosfatos presente en algunos agentes surfactantes, junto con otros nutrientes, contribuyen a la superpoblación de la flora acuática, especialmente algas, produciendo la eutrofización (Yu y col., 2006; Lorets y col., 2008).

Por otra parte, se ha determinado que los insu- mos cosméticos más empleados a nivel mundial son los agentes surfactantes, representando un 32% del consumo general en ingredientes cosméticos, seguido de los polímeros acondicionadores (Bourgeat, 2005). Estos estudios permiten inferir que productos cosméticos tales como champúes y acondicionadores, son capaces de producir efectos negativos en el ecosistema, no solo por contener los ingredientes antes señalados, sino también por su elevado uso entre los consumidores (Kumar, 2005).

En los últimos tiempos se ha observado una tendencia creciente en la conservación del ambiente por parte de las industrias, consumidores y entes gubernamentales. Es por ello que diferentes organizaciones y empresas se han orientado al desarrollo de productos e ingredientes sustentables, menos perjudiciales para el ecosistema, es decir, los que comúnmente se conocen como naturales u orgánicos (Muelli, 2007; San Miguel, 2007a).

Aunque en muchas oportunidades se use indiscriminadamente los términos natural y orgánico con el mismo significado, estos dos conceptos no representan lo mismo. Por lo general, un producto natural contiene un menor porcentaje de ingredientes procedente de la agricultura ecológica que el producto orgánico (San Miguel, 2007b).

Estos cosméticos, los cuales mencionaremos como ecológicos, tienen como base la agricultura orgánica que se diferencia de la agricultura tradicional por dar prioridad al ambiente, a la justicia social, al crecimiento económico racional y sustentable, preservando la biodiversidad, los ciclos y las actividades biológicas de los suelos (Ribeiro, 2009).

Un cosmético ecológico debe brindar al consumidor los mismos beneficios de un producto comercial no ecológico (convencional), por lo que la evaluación de sus parámetros fisicoquímicos, específicamente las propiedades de flujo y la viscosidad, pueden apor-

tar valiosa información al formulador; con ellas se podría predecir la estabilidad del producto y el comportamiento del mismo durante su consumo, es decir, desde la salida del envase, hasta su aplicación, y así desarrollar cosméticos de calidad que procuren la conservación y sostenibilidad del ecosistema (Schott, 2003; San Miguel, 2007b; Beazin, 2009).

En Venezuela se está comenzando a tomar conciencia de la importancia que el tema de la protección ambiental presenta para las generaciones futuras. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un champú y un acondicionador ecológico, para comparar su comportamiento reológico y viscosidad con un champú y un acondicionador no ecológico existente en el mercado nacional.

Materiales y métodos

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se elaboró por triplicado 2 lotes de 100g cada uno de un champú y un acondicionador ecológico. Los productos se desarrollaron partiendo de fórmulas referenciales, tomadas de revisiones bibliográficas y siguiendo las normativas establecidas por los organismos internacionales encargados de la certificación orgánica (OASIS, 2009; ECOCERT, 2012). Un gran porcentaje de los ingredientes empleados en la elaboración de las fórmulas, presentó el sello oficial de certificación ecológica, los demás ingredientes eran permitidos por los organismos certificadores.

La técnica de manufactura que se llevó a cabo para la elaboración de los productos fue la siguiente:

Champú ecológico: Se pesó cada uno de los ingredientes que conforman la formulación. En el agua se disolvió el agente preservante, un acondicionador (galactoarabinan) y se hidrató la goma xantán, luego se añadió la solución de sorbitol al 70%. Por último se agregaron, con agitación lenta, los agentes surfactantes y demás ingredientes. Se dejó en reposo para reducir la espuma formada, se ajustó el pH con el ácido cítrico y se envasó en frascos plásticos de Tereftalato de Polietileno (Polyethylene terephthalate, PET, de acuerdo a su nombre en inglés), de 35 mL. El proceso se realizó a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Tabla I).

Acondicionador ecológico: Se pesó cada uno de los ingredientes y se procedió a formar una emulsión estable, en donde tanto los ingredientes de la fase oleosa (fase A), como de la fase acuosa (fase B), se calentaron a $75^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se mezclaron a esa misma temperatura con agitación continua, hasta alcanzar los $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se incorporaron los ingredientes termosensibles correspondientes a las fases C, D y E, así como, la fase F para ajus-

tar el pH y se envasaron en frascos de plásticos tipo PET de 35 mL (Tabla II).

Tabla I
Fórmula champú ecológico

Ingredientes según la Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI)	Justificación	% p/p
Cocamidopropyl betaine	Surfactante anfotérico	24,24
Lauril glucoside	Surfactante no iónico	14
Xanthan gum	Viscosante	0,40
Gluconolactone and sodium benzoate and calcium gluconate	Agente preservante	0,76
Galactarabinan	Acondicionador	1,5
Sorbitol (Sol. 70%)	Acondicionador	2
Hydrolyzed wheat protein	Acondicionador	0,50
Mangifera indica (mango) fruit extract	Fragancia	2
Citric acid (Sol. 50%)	Ajuste de pH	0,4
Water	Vehículo	54,20

Tabla II
Fórmula acondicionador ecológico

Fase	Ingredientes según la Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI)	Justificación	% p/p
A	Glyceryl stearate and Cetearyl alcohol and Cetyl palmitate and Cocoglycerides	Viscosante	2,4
	Butyrospermum parkii (shea) butter	Acondicionador	0,2
	Mangifera indica (mango) seed butter	Acondicionador	0,2
	Bertholletia excelsa seed oil	Acondicionador	2
	Oleyl alcohol	Acondicionador	2
	Isopropyl myristate	Acondicionador	2
	Sweet almond oil	Acondicionador	0,2
	Olea Europaea (Olive) Fruit Oil	Acondicionador	0,2
	Cetearyl olivate sorbitan olivate	Emulsificante	4,8
	Cetyl palmitate and sorbitan palmitate and sorbitan olivate	Estabilizante	1,2
B	Guar hydroxyl propyl trimonium chloride	Acondicionador	0,3
	Gluconolactone and sodium benzoate and calcium gluconate	Agente preservante	1,5
	Sorbitol (Sol. 70%)	Acondicionador	2
	Water	Vehículo	76,4
C	Tocopherol	Antioxidante	1
D	Mangifera india (mango) fruit extract	Fragancia	2
E	Hydrolyzed wheat protein	Acondicionador	1
F	Sodium hidroxide (Sol. 50%)	Ajuste de pH	0,6

Para todas las formulaciones se les determinó, 48 horas después de su fabricación, el comportamiento reológico, viscosidad y tixotropía.

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO Y VISCOSIDAD DE LOS PRODUCTOS

Las determinaciones del comportamiento reológico y de la viscosidad se realizaron por triplicado en un reómetro de cono y plato Brookfield RV DV-III Ultra con la aguja CPE-51 a una temperatura de 26 °C ± 2 °C y a diferentes velocidades de deformación, en secuencia ascendente y descendente, con intervalos de 30,2 segundos, para así obtener el reograma completo de cada muestra (Marriott, 2002). Los valores se expresaron en mPa.seg (miliPascal/segundo).

TIXOTROPÍA

Las determinaciones de la tixotropía se realizaron por triplicado en un viscosímetro rotacional LVT Visco Star plus, empleando la aguja L3 y L4 a una temperatura de 26°C ± 2°C. Se evaluó la variación de la viscosidad en función del tiempo manteniendo la velocidad de deformación constante (Schott, 2003).

La selección del champú y del acondicionador convencional para realizar la comparación con los productos ecológicos, se basó en la ausencia de ingredientes complejos y de silicona. Las fórmulas cualitativas de los productos convencionales declaraban los siguientes ingredientes:

CONVENTIONAL SHAMPOO

Ingredients*: Water, Sodium Lauryl Sulfate, Cocamidopropyl Betaine, Cocamide, Sodium Chloride, Glycerin, Fragrance, Camomilla recutita (Matricaria) floral extract, EDTA, citric acid, Cloroisotiazolinona methyl, methyl-isothiazolinone, Yellow # 5.

CONVENTIONAL CONDITIONER

Ingredients*: Water, Cetyl Alcohol, Sorbitol, Isopropyl lanolate, Cetrimonium bromide, Fragrance, Methylparaben, citric Acid, Yellow # 5.

Resultados y discusión

Las características organolépticas del champú y del acondicionador desarrollado, específicamente el olor y el color, fueron característicos para este tipo de cosméticos. Al comparar la apariencia de los productos, se observó una mayor fluidez en el champú ecológico y en el acondicionador convencional, pre-

* Según la Nomenclatura de Ingredientes Cosméticos (INCI).

sentando una viscosidad de 3000 y 600 mPa.seg respectivamente, para un gradiente de velocidad de 50 seg^{-1} .

El comportamiento reológico y la viscosidad fueron evaluados 48 horas después de la fabricación de los productos, con la finalidad de asegurar que los sistemas se encontraran estables. El reograma de los champús y acondicionadores, tanto los ecológicos como los convencionales, mostraron un comportamiento no-newtoniano pseudoplástico, en donde la viscosidad del fluido disminuye a medida que se incrementa el gradiente de velocidad (Figuras 1, 2 y 3). Este comportamiento se debe a que las estructuras complejas que componen el sistema se encuentran inicialmente (en el estado de reposo) desordenadas y enredadas, pero a medida que se aplica una fuerza de deformación sobre ellas, se van alineando en la dirección y sentido de la misma, presentando menor resistencia a fluir a medida que se incrementa dicha fuerza (Marriott, 2002). El comportamiento pseudo-

plástico es particularmente deseado en este tipo de formulaciones, ya que va a facilitar la aplicación de los productos, debido a la disminución de la viscosidad a medida que estos se distribuyen en el cabello.

Al comparar estadísticamente el comportamiento reológico de los champús y acondicionadores a través de la prueba t de comparación de pendientes, con 99% de exactitud (Mendenhall y col., 2002), se observó que existía una diferencia significativa entre los champús, evidenciándose en el ecológico valores de viscosidad inferiores a los del convencional (Figuras 1 y 2). Este resultado podría permitir que el consumidor perciba al champú ecológico como un producto ligero, incapaz de producir un impacto negativo sobre el ambiente.

Entre los acondicionadores no se observó diferencia significativa, a pesar de que las viscosidades del ecológico fueron ligeramente superiores a las del convencional, lo que favorece la capacidad acondicionadora del producto ecológico en el cabello (Figura 3).

Adicionalmente se logró observar en el champú ecológico, una ligera tixotropía que no se manifestó en el champú convencional. Los sistemas tixotrópicos se caracterizan por ser dependientes del tiempo y presentar, en los gráficos de los reogramas, un desplazamiento entre las líneas de los valores crecientes y decrecientes de gradiente de velocidad; por esta razón se producen diferencias entre los valores de viscosidad. El espacio formado entre las dos líneas recibe el nombre de anillo de histéresis y es indicativo de la tixotropía del producto. Al aplicar una fuerza de deformación la estructura se modifica, impidiendo un reordenamiento inmediato al reducir o eliminar dicha fuerza; por lo que se requiere de un tiempo para restaurar el equilibrio dentro del sistema (Marriott, 2002; Gaspar y Campos, 2003). En el reograma del champú ecológico la curva descendente presentó valores de viscosidad superiores a los de la curva ascendente, formando el conocido anillo de histéresis (Figura 1), mientras que en el champú convencional las dos curvas se superponen (Figura 2).

La tixotropía del champú ecológico también quedó evidenciada cuando se determinó su viscosidad en función del tiempo, apreciándose una disminución de ésta cuando es evaluada a una velocidad de corte constante (Figura 4), mientras que para el champú convencional la viscosidad prácticamente no varió (Figura 5). La tixotropía es un fenómeno favorable más no imprescindible en este tipo de champús; sin embargo, en los acondicionadores esta característica sí es deseada, ya que por ser una emulsión, es importante que después de realizar la

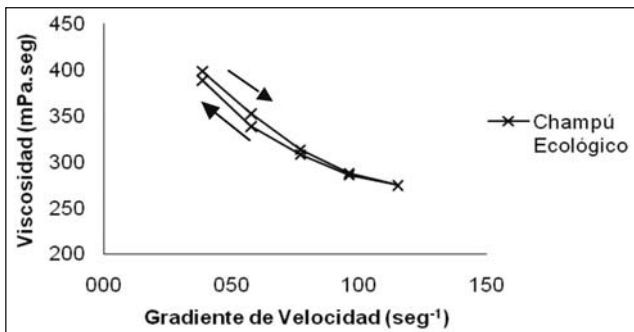


Figura 1. Reograma champú ecológico, T = 26°C ± 2°C

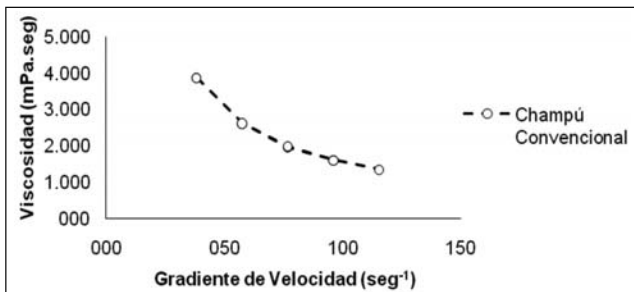


Figura 2. Reograma champú convencional, T = 26°C ± 2°C

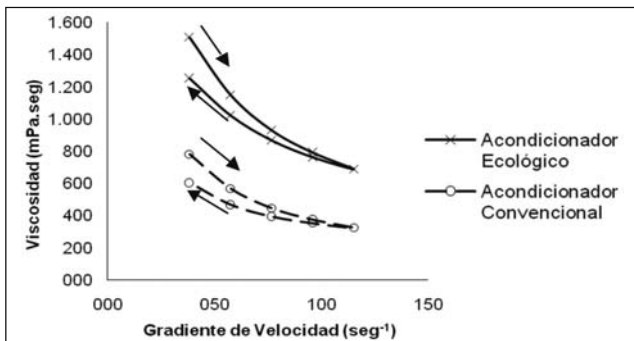


Figura 3. Reograma de los acondicionadores, T = 2°C ± 2°C

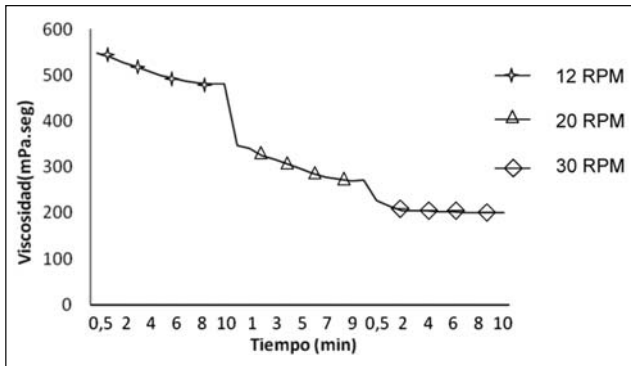


Figura 4. Determinación de la viscosidad del champú ecológico en función del tiempo (de 1 a 10 min) a velocidades de corte constante, $T = 26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

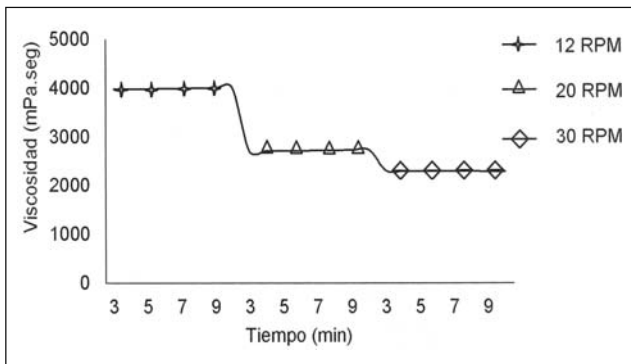


Figura 5. Determinación de la viscosidad del champú convencional en función del tiempo (de 1 a 10 min) a velocidades de corte constante, $T = 26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

aplicación del producto su viscosidad en el envase se haya reducido, este retome su estado inicial, aumentando nuevamente su viscosidad, de tal manera que disminuyan los choques entre las moléculas que puedan conducir a inestabilidades físicas (separación de las fases) y/o químicas (degradación) (Schott 2003; Lavaselli y Rasia, 2004; Malkin e Isayev, 2006).

Para confirmar la presencia de tixotropía en los acondicionadores se realizó el mismo procedimiento

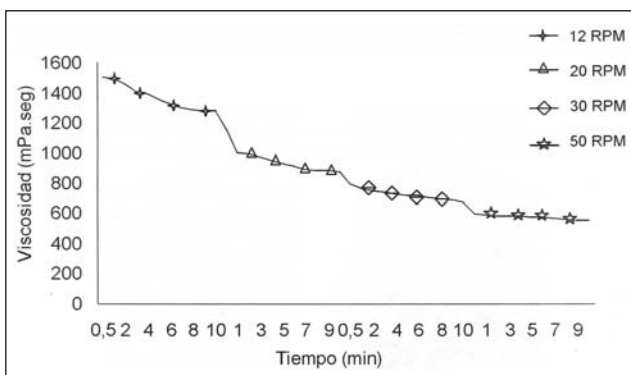


Figura 6. Determinación de la viscosidad del acondicionador ecológico en función del tiempo (de 1 a 10 min) a velocidades de corte constante, $T = 26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

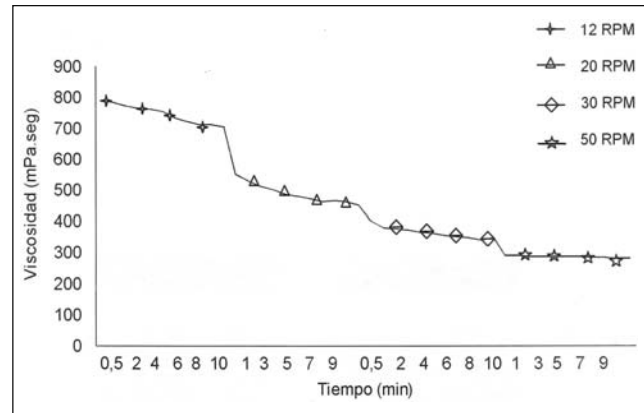


Figura 7. Determinación de la viscosidad del acondicionador convencional en función del tiempo (de 1 a 10 min) a velocidades de corte constante, $T = 26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

antes descrito para los champús. En las Figuras 6 y 7 se observa que a una misma velocidad de corte, la viscosidad va disminuyendo con el transcurrir del tiempo, lo cual es indicativo de la presencia de tixotropía. Al igual que en el champú ecológico, en los reogramas del acondicionador ecológico y convencional, se formó el anillo de histéresis debido a que la curva descendente presentó valores de viscosidad superiores a los de la curva ascendente (Figura 3).

Conclusiones

El desarrollo de productos cosméticos ecológicos (champú y acondicionador) con características de flujo similares a la de los convencionales, permite introducir al mercado local una nueva tendencia ecológica con los mismos beneficios y ventajas competitivas que ofrecen algunos cosméticos convencionales, además de ser más naturales, menos perjudiciales para el ambiente y contribuyentes con el desarrollo sustentable de Venezuela y del mundo.

Recomendaciones

Teniendo como base los resultados obtenidos de este estudio se sugiere continuar la investigación en el área de los cosméticos ecológicos e incentivar a la industria cosmética venezolana al desarrollo de productos que puedan contribuir con la conservación del ambiente.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto N° I.I.F. 08-2011. A ABBA CHEM SUPPLY y CONGNIS, por su colaboración.

Referencias bibliográficas

- Beazin D. 2009. What exactly is corporate responsibility towards nature?: Ecological responsibility or management of nature? A pluri-disciplinary standpoint. *Ecological Economics* 68(3): 634-642.
- Bourgeat A. 2005. A global view on specialty chemicals: The supplier perspective. *Cosmetics & toiletries* 120(1): 47-56.
- Ecocert. 2012 Norma que define los cosméticos naturales y ecológicos. Disponible en: <http://www.ecocert.com/sites/default/files/u3/Norma-Ecocert.pdf>
- Gaspar L. Campos M. 2003. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *International journal of pharmaceuticals*. 250(1): 35-44.
- Kumar S. 2005. Exploratory analysis of global cosmetic industry: major players, technology and market trends. *Technovation* 25(11): 1263-1272.
- Lara P, Gómez A, González E. 2008. Reactivity and fate of synthetic surfactants in aquatic environments. *Trends in Analytical Chemistry* 27(8): 684-695.
- Lavaselli S, Rasia R. 2004. Reología y estabilidad de excipientes para productos dermatológicos, elaborados con concentraciones variables del mismo emulgente. *Acta Farmacéutica Bonarense*. (Revista en internet). (7 de febrero 2013). 25(1): 59-60. Disponible en: <http://www.latamjpharm.org/search.php>
- Lorets L, Api A, Babcock L, Barrañ L, Burdick J, Cater KC, Jarrett G, Mann S, Pan YH, Re TA, Renskers KJ, Scraftford CG. 2008. Exposure data for cosmetic products: facial cleanser, hair conditioner, and eye shadow. *Food and chemical Toxicology* 46(5): 1516-1524.
- Malkin A, Isayev A. Rheology. Concepts, methods, & applications. Chemtec Publishing, Toronto. 2006.
- Marriott C. Rheology. En: Aulton ME (ed). The science of dosage form design. 2^{da} ed. Elsevier Limited, London. 2002. pp. 41-54.
- Mendenhall W, Beaver R, Beaver B. Introducción a la probabilidad estadística. Internacional Thomson editores, S.A., USA. 2002. pp. 395-400, 424-430, 488-490.
- Muelli M. Cosméticos ecológicos y naturales ¿garantía para los consumidores? En: XVIII Congreso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos. COLAMIQC, Guatemala. 2007.
- OASIS Organic and sustainable Industry Standards, Inc. Promoting Organic and Sustainable Industry Standards (sede Web). Australia; [actualizada en el 2009; acceso 7 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.oasis-seal.org/index.htm>
- Ribeiro C. 2009. Formulación de cosméticos orgánicos. *Cosmetics & Toiletries (Latinoamérica)* 8(1): 21-26.
- San Miguel M. 2007a. Reglamentación de los orgánicos. *Cosmetics & Toiletries (Latinoamérica)* 6(4): 18.
- San Miguel M. 2007b. Cosméticos Orgánicos y Naturales. *Cosmetics & Toiletries (Latinoamérica)* 6(4): 22-27
- Saouter E, Pittinger C, Feijtel T. 2001. Aquatic environmental impact of detergents: from simple to more sophisticated models. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50(2): 153-159.
- Schott H. Reología. En: Gennaro A (ed). Farmacia de Remington. 20^{va} ed. Panamericana, Buenos Aires. 2003. pp. 386-410.
- Yu J, Bouwer E, Coelhan M. 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural water management* 86(1-2): 72-80.

ÍNDICE DE DESCRIPTORES

Vol. 77 - N^{os} 1 y 2 - 2014

A

Acondicionador, **92**
Adrenomedulina, **46**
Aldosterona, **31**
Angiotensina II, **31**
Antibacterianos, **8**
Apoyo social, **16**

B

Biomarcadores, **84**
Bioplex, **84**

C

Calidad de vida, **16**
Cáscara sagrada, **65**
Cáscara semillas cacao, **40**
Cerebelo, **46**
Champú, **92**
Citotoxicidad, **8**
Clorhidrato de verapamilo, **74**
Comportamiento reológico, **92**
Control de calidad, **74**
Croton malambo, **8**

D

Diabetes, **84**
Bioisósteros, **54**
Diseño estadístico experimental central compuesto, **26**
Diterpenos, **8**

E

Ecológico, **92**
Enzima convertidora de angiotensina, **31**
EQ-5d, **16**
ERK1/2, **46**
Estudiantes, **16**
Exfoliante, **40**

F

Flúor, **54**
Formulación, **40**

G

Gránulos, **26**
Grupo pentafluorosulfanilo, **54**

H

Hipertensión, **46**

I

Indicadores de estabilidad, **74**
Inflamación, **84**
Inteligencia emocional, **2**

O

Obesidad, **84**

P

Preeclampsia, **31**

Q

Química medicinal, **54**

R

Reología, **40**
Rhamnus purshiana, **26**
RP-HPLC, **74**

S

SF-36, **16**
Simulación, **65**

T

Tabletas comprimidas, **65**

V

Validación, **74**
Viscosidad, **92**

ÍNDICE DE AUTORES

Vol. 77 - N^{os} 1 y 2 - 2014

A

Andueza Isabel, **40, 92**
Arvelo Francisco, **8**

B

Baffi Patricia, **74**
Bastardo Yajaira M, **16**
Billet Elodie, **84**
Bor Marisabel, **74**
Burgos Ignacio, **2**
Bucarito Luisa Carolina, **92**

C

Cabrera Ana B, **40**
Camacho Elsa, **31, 84**
Cuevas López Luisana A, **26**

F

Figueira Leticia, **46, 84**

G

Garrido María del Rosario, **84**

H

Hernández Jesús, **84**

I

Israel Anita, **31, 46, 84**

L

López Simón E, **54**
López Yubizali, **84**

M

Martínez Higuera Julibel S, **65**
Mathison Yaira, **84**
Matos María Gabriela, **84**

P

Padilla Fanny C, **40**
Pastorello Mariella, **84**

R

Rodríguez Rodríguez Enriqueta C, **26, 65**
Romero Eduardo, **84**
Rodríguez De Sousa Goretti, **92**

S

Saturno Arias Dany J, **65**
Saturno Arias Jenny F, **26, 65**
Sojo Felipe, **8**
Suárez Alírica I, **8**

T

Taddei Antonieta, **8**

V

Vieira Vieira María Esther, **92**

Normas de Publicación

La *Revista de la Facultad de Farmacia* fue creada en 1959 y constituye una publicación periódica, arbitrada, de aparición semestral, destinada a promover la difusión de artículos científicos en el área de las ciencias de la salud, así como en áreas básicas y aplicadas relacionadas con la obtención, ensayos, análisis, usos y producción de medicamentos, alimentos, cosméticos, tóxicos y sustancias relacionadas.

Está basada en la existencia de un Comité Editorial, consistente en un editor-director, editores asociados y una Comisión Editorial. Los manuscritos que publica pueden ser de autores nacionales o extranjeros, residentes o no en Venezuela, en español o inglés. Los manuscritos deben ser trabajos inéditos y su aceptación por el Comité Editorial implica que no ha sido publicado, ni está en proceso de publicación, en otra revista en forma parcial o total. Igualmente podrán ser publicadas revisiones o cartas al editor. El manuscrito deberá ir acompañado de una carta de solicitud firmada por el autor responsable. En caso de ser aceptado, el Comité Editorial no se hace responsable del contenido expresado en el trabajo publicado. Aquellos manuscritos que no se acojan a las condiciones indicadas o que sean rechazados por dos de los árbitros que dictaminen sobre su calidad y contenido, no serán publicados y serán devueltos a los autores.

Forma y preparación de los manuscritos

Para la publicación de trabajos científicos en la *Revista de la Facultad de Farmacia*, los mismos estarán de acuerdo con los requisitos originales para su publicación en revistas biomédicas, según el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (2003). Además, los editores asumen que los autores de los artículos conocen y han aplicado en sus estudios la ética de experimentación (Declaración de Helsinki, y el *Código de Bioética y Bioseguridad*, 2da. edición, 2002, del Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Los manuscritos deben ser enviados en original y dos copias impresas dentro de un sobre de papel grueso, incluyendo copias fotográficas y figuras entre cartones para evitar que se doblen, con una versión en disquete o CD-ROM. Los manuscritos deberán ser enviados al Editor-Director a la Dirección de la Revista, en el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Los Chaguaramos, Apartado Postal 40109, Nueva Granada, Caracas, Venezuela.

Los manuscritos deben estar escritos a doble espacio, en papel Bond blanco tamaño carta, por una cara, sin borrones ni tachaduras y con márgenes de 2,5 cm. Todas las páginas deben ser numeradas correlativamente, empezando por el título. El número de la página deberá colocarse en el ángulo superior derecho de cada página. Su longitud no debe exceder de veinte páginas, excluyendo el espacio destinado a figuras, tablas y leyendas.

Cada uno de los componentes del original deberá comenzar en página aparte, en la secuencia siguiente:

- a. Página del título, nombre completo de(l) (los) autor(es) y su filiación institucional.
- b. Resumen y palabras clave.
- c. Texto (Introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones).
- d. Agradecimientos.
- e. Referencias bibliográficas.
- f. Tablas: cada una de las tablas en páginas aparte, completas, con título y llamadas al pie de la tabla.
- g. Figuras: cada una en página aparte con su título.
- h. Leyenda de las figuras.

La página del título deberá contener:

1. Título del artículo en español e inglés, conciso e informativo, no mayor de veinte palabras.

Primer nombre e inicial del segundo nombre y apellido(s) de los autores (con una llamada para identificar al pie de página al autor responsable de la correspondencia, indicando su dirección electrónica). Afiliación institucional de cada uno de los autores.

2. La segunda página debe contener un resumen en español e inglés, con un máximo de 250 palabras. El texto debe dar una visión general del trabajo, señalar someramente el propósito, los métodos y los hallazgos. No se deben citar referencias.

El resumen debe hacer énfasis en los aspectos nuevos e importantes del estudio o de las observaciones. Inmediatamente después del resumen, proporcionar o identificar como tales: 3-10 palabras clave que ayuden a los indexadores en la construcción de índices cruzados de su artículo y que pueda publicarse con el resumen; utilice los términos del encabezamiento temático (Medical Subject Heading (Mesh)) del Index Medicus.

3. En cuanto al texto, debe dividirse en: Introducción, materiales y métodos, resultados y discusión. La **introducción** debe aparecer después del resumen, debe contener lo esencial para situar el problema y la justificación del trabajo utilizando las referencias más relevantes. Los **materiales y métodos** deben contener la descripción breve y clara que permita la comprensión y la reproducibilidad del trabajo. En caso de técnicas y métodos clásicos ya publicados, se debe indicar sólo la referencia. Los **resultados** deben ser presentados en forma clara y precisa, con un mínimo de discusión o interpretación personal. Todas las figuras y tablas deben ser citadas en el texto. La **discusión** debe ser restringida a la interpretación de los resultados y eventualmente a comparar con los resultados de otros autores. Las **conclusiones** pueden ser incluidas dentro de la discusión; sin embargo, se puede hacer una sección aparte, indicando de forma clara y concisa los nuevos hallazgos. Se pueden incluir recomendaciones de aplicación práctica. Los **agradecimientos** deben hacerse a las personas o instituciones que han hecho contribuciones al estudio.

4. Las **referencias bibliográficas**: Las mencionadas en el texto deben citarse escribiendo entre paréntesis el apellido y año. Ejemplo: (Ávila, 1983); (Brenes y Rodríguez, 1961); (Zimmermann y col., 2003).

La lista de referencias bibliográficas llevará por título «Referencias bibliográficas» y su ordenamiento será según el orden alfabético manteniendo la estructura siguiente: Autor(es): Apellido(os), inicial del nombre, año, título del artículo, revista (abreviatura aceptada), Vol. número, páginas (en el caso de artículos científicos). No se aceptarán trabajos que no se ajusten a las normas presentes.

Ejemplos:

Ávila JL. 1983. New national approaches to Chagas disease chemotherapy. *Interciencia* 8: 405-417.

Ávila JL, Ávila A, Muñoz E. 1981. Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 39: 769-774.

En el caso de que se trate de referencias de libros debe contener:

Nombre(es) de autor(es), capítulo del libro. En: título de libro, número de la edición (excepto si es la primera), editorial, lugar de la edición, año de publicación y páginas.

Ejemplo:

Decampo R, Moreno SNJ. Free radicals intermediates in the antiparasitic action of drugs and fugacitic cells. En: *Free radicals in Biology*. Eds: WA-Pryors Academic Press, 1984. pp. 243-288.

5. **Tablas**: Las tablas deben presentarse en hojas separadas, a doble espacio, y numeradas correlativamente en números romanos con el título en la parte superior. No se debe duplicar material del texto o de las figuras. En caso necesario coloque material explicativo en notas al pie de la tabla y no en el encabezamiento; explique en notas al pie de la tabla las abreviaturas no estandarizadas o utilizadas; identifique claramente las variables tales como desviación estándar y error estándar de la media; cite cada tabla en orden correlativo dentro del texto; cite la fuente de información al pie de la tabla si ésta no es original.

6. **Figuras**: Las figuras deben ser de buena calidad, en papel con fondo blanco. Las fotografías de especímenes anatómicos, de lesiones o de personas, deberán tener suficiente nitidez como para identificar claramente los detalles importantes. En caso de tratarse de fotos en colores, los gastos de su impresión correrán a cargo del autor del trabajo.

Todas las figuras deben ser identificadas en el reverso de la hoja, indicando número de la figura, apellidos y nombres de los autores (Ejemplo: Fig. 1; Fig. 2; etc.).

En caso de fotografía de personas evite que el sujeto sea identificable, o acompañe de la autorización escrita de la misma.

Las leyendas de las figuras deberán presentarse a doble espacio en página aparte y usar el número que corresponde a cada figura. Cuando se usen símbolos y fechas, números o letras para identificar partes en las figuras, identifíquelas y explique cada una en la leyenda. Si se trata de fotomicrografía, indique la escala e identifique el método de coloración.

Fórmulas y ecuaciones: Éstas deben presentarse claramente para su reproducción.

PUBLICACIONES 2012 CDCH-UCV

Bravo, Ricardo, Lucía Martino, Marcel Rupcich y Miguel Cerralzoza
BIOMECÁNICA Y ANALISIS DE LA MARCHA HUMANA

Jáuregui Torres, Damielis
GUÍA ILUSTRADA DE LAS EPIDERMIS FOLIARES DE ANGIOSPERMAS PRESENTES EN VENEZUELA

López Villa, Manuel
ARQUITECTURA E HISTORIA. CURSO DE HISTORIA DE LA ARQUITECTURA. Vols. I y II
(2ª edición)

Perera, Miguel Ángel
VENEZUELA ¿NACIÓN O TRIBU? LA HERENCIA DE CHAVEZ

Romero Vecchione, Eduardo, Yaira Mathison Natera y Francisco Rosa Alemán
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Saldívar, Carlos Miguel
ESTRATEGIAS DE ANESTESIA PARENTERAL EN CIRUGÍA DE PEQUEÑOS ANIMALES

Sedano, Mercedes
MANUAL DE GRAMÁTICA DEL ESPAÑOL, CON ESPECIAL REFERENCIA AL ESPAÑOL DE VENEZUELA
(Coedición con la Comisión de Estudios de Postgrado de la Facultad de Humanidades y Educación)

Nuestras publicaciones pueden ser adquiridas en el Departamento de Relaciones y Publicaciones del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, ubicado en la avenida Principal de La Floresta, Quinta Silería, La Floresta, Caracas.

Telefonos: 286.8648 (Directo) 284.7077 – 286.7666 • Fax: Ext. 244
E-mail: publicaciones@cdch-ucv.net

Igualmente, están disponibles en **Ventana UCV**, la nueva librería ucevista, ubicada en la planta baja del edificio de la Biblioteca Central.

Toda la información inherente al Programa de Publicaciones puede ser consultada en: www.cdch-ucv.net



REVISTA FACULTAD DE FARMACIA N° 77 Nos. 1 y 2

Se imprimió durante el mes de diciembre de 2014

por Diseño Gráfico WILMARIS, R.L.

en la ciudad de Caracas

nicolasgc2732@gmail.com