

RESEÑA

Determinaciones analíticas realizadas como contribución al desarrollo de un nuevo ingrediente farmacéutico activo obtenido a partir de la palma real

MSc. Eduardo Antonio Rodríguez Leyes

Investigador Auxiliar.

Departamento de Química Farmacéutica, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

27 de noviembre de 2012

TRABAJO PRESENTADO EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS.

La hiperplasia prostática benigna (HPB) constituye uno de los procesos patológicos más relevantes que afectan la próstata, fundamentalmente en hombres mayores de 50 años. El amplio uso de la fitoterapia a nivel internacional en el tratamiento de esta condición sustentó el empleo de una estrategia similar en la población cubana, máxime al tener en cuenta que el fitomedicamento más empleado, el extracto lipídico de Saw palmeto (*Serenoa repens*), se obtiene de los frutos de una palma (arecacea), cuya familia es muy abundante en nuestro medio. Teniendo en cuenta la amplia presencia en Cuba de especies de la familia Arecaceae, se llevaron a cabo determinaciones analíticas que contribuyeron al desarrollo de un nuevo ingrediente farmacéutico activo (IFA), obtenido a partir de una arecacea nativa de Cuba, con potencialidades en el tratamiento de la HPB.

Las determinaciones analíticas realizadas a partir de los frutos enteros y maduros de cinco de las arecaceas más abundantes en el país, permitieron determinar sus contenidos de aceite, así como conocer las composiciones de ácidos grasos (AG) totales y libres en dichos aceites. De manera general, las especies estudiadas resultaron promisorias como posibles fuentes de obtención de un nuevo IFA para el tratamiento de la HPB, dada sus similitudes con *S. repens* en cuanto al contenido total de AG y la presencia de AG que pudieran tener efectos farmacológicos. Sin embargo, teniendo en cuenta que el aceite de *R. regia* fue el que presentó la composición de AG más parecida a la del aceite de *S. repens*, siendo además el aceite con mayor contenido total de AG y el de mayor concentración en el fruto de origen, fue *R. regia* la especie seleccionada para el posible desarrollo de un nuevo IFA. Otros elementos a favor de esta elección fueron que *R. regia* es la arecacea más abundante en el país, donde crece de forma espontánea, siendo además, la única de las especies estudiadas que fructifica durante todo el año, todo lo cual permitiría asegurar la disponibilidad de la materia prima requerida en las etapas de investigación, producción y comercialización.

El siguiente paso consistió en determinar cuál era el estado de maduración más adecuado para obtener el nuevo IFA (D004); considerado este como el extracto lipídico con AG libres obtenido a partir del aceite de *R. regia* (ARr), ya que este demostró efectos farmacológicos superiores al aceite. Para esto se determinaron las composiciones de AG libres y los rendimientos de obtención de D004 obtenidos a partir de aceites extraídos de frutos verdes, pintones y maduros. Se determinó que los contenidos totales de AG son similares en los tres tipos de extractos, aunque la proporción de ácido láurico aumentó con la maduración, con contenidos de más de 15 % en los lotes obtenidos de frutos pintones y maduros. Estos últimos fueron además, los que tuvieron el efecto farmacológico deseado y los que presentaron los mayores rendimientos de obtención. No obstante, para asegurar elevados contenidos de ácido láurico, se decidió continuar los estudios de investigación-desarrollo con frutos maduros.

Atendiendo al papel protagónico de los AG en los efectos farmacológicos del D004, se consideró que su contenido era un atributo crítico de calidad, por lo que se implementaron y validaron metodologías analíticas para determinar la composición de AG en el IFA y en el ARr. Estas cumplieron con los criterios requeridos de especificidad, linealidad, exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia), por lo que pueden emplearse en el control de calidad y en los estudios de estabilidad de estas sustancias.

Con vistas a establecer una metodología de secado eficiente para los frutos maduros se evaluaron dos variantes: condiciones ambientales (30 °C) y 60 °C con recirculación de aire. En ambas condiciones se alcanzaron humedades que impiden la proliferación microbiana (< 14 %), no obstante, se seleccionó la temperatura ambiente al no requerir gastos energéticos ni equipamiento; con lo cual quedó establecido el secado de los frutos a temperatura ambiente y a la sombra, durante 15 d. Estos frutos molidos posteriormente a un tamaño de partícula $\leq 2,36$ mm, constituyen el material vegetal parcialmente seco y molido (MVPSM) de *R. regia*.

Con el objetivo de determinar la época más idónea de recolección se decidió determinar en cuáles épocas del año el contenido de ácido láurico en el aceite era superior al 11 %, lo cual había permitido obtener lotes de D004 farmacológicamente activos, con contenidos de este AG > 15 %. Se comprobó que los contenidos de este ácido en los aceites de frutos recolectados durante dos años fueron > 11%, con un contenido promedio máximo de 17 % en agosto, por lo que la recolección puede ser realizada durante todo el año. Adicionalmente, los contenidos de aceite determinados, aunque variaron significativamente de un año a otro en la mayoría de los meses, fueron en todos los casos mayores que 16 %, lo cual supera al contenido máximo encontrado en el MVPSM de *S. repens* (7 – 11 %). Según este criterio, no obstante, pudiera preferirse el período entre julio y octubre, en el que se obtuvieron contenidos promedio de aceite superiores al 24 % y que incluye el mes en el que se obtuvo el aceite con mayor contenido de ácido láurico. Las determinaciones realizadas de los contenidos de ácido láurico y de aceite permiten asegurar que los frutos maduros recolectados durante todo el año pueden ser empleados en la obtención del ARr, materia prima de la producción de D004.

La evaluación de las principales características físicas y químicas del MVPSM, correspondientes a 20 lotes obtenidos de frutos maduros recolectados durante todo el año, mostraron humedades residuales entre 7,3 y 9,6 %, cenizas totales entre 3,45 y 4,37 %

e insolubles en ácido entre 0,60 y 1,35 % (expresadas sobre una base anhidra), contenido de aceite entre 16,4 y 28,6 %, y contenido de AG entre 13,4 y 23,1 %. El contenido microbiológico en los 20 lotes cumplió con los límites establecidos (USP 33, 2010). A partir de las determinaciones realizadas, se pudieron establecer por primera vez las especificaciones de calidad del MVPSM de *R. regia*.

Con vistas a establecer el tiempo de vida útil de los frutos secos sin moler de *R. regia* y del MVPSM, se estudió la estabilidad de ambos. Las determinaciones realizadas permitieron determinar que los frutos parcialmente secos, envasados en sobres de nailon cerrados y almacenados en las condiciones de la zona climática IV (30 °C y 70 % HR), presentan una mayor vida útil cuando se mantienen enteros (36 meses) que cuando se muelen (12 meses).

Una vez conocidas las características que definen el MVPSM, se evaluaron las características físicas, químicas y microbiológicas del ARr obtenido mediante extracción hexánica a partir de dicho MVPSM. La evaluación de 12 lotes piloto permitieron describir este aceite como un líquido oleoso, opaco, de color amarillo-naranja a pardo-verdoso, con densidad relativa entre 0,874 y 0,970 g/mL; índices de refracción entre 1,454 y 1,463; de saponificación entre 190,0 y 221,8; de acidez entre 5,2 y 26,4 %, de yodo entre 49,2 y 55,8; contenido de material no saponificable entre 2,0 y 5,0 %; contenido de AG entre 69,4 y 89,4 % y microbiológico ≤ 1000 bacteria/g, ≤ 100 hongos/g, ausencia de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. y *C. albicans*. Por su parte, los estudios realizados para determinar la estabilidad de este aceite, obtenido a escala piloto y envasado en frascos de vidrio transparente, permitieron establecer por primera vez su tiempo de vida útil: 24 meses en las condiciones de la zona climática IV (30 °C y 70 % HR) y 12 meses en condiciones más drásticas (40 °C y 75 % HR). Estas determinaciones permitieron establecer las especificaciones de calidad del ARr, aceite obtenido por primera vez a escala piloto a partir de frutos enteros (semilla y mesocarpio) de *R. regia*, aspecto imprescindible para la producción del D004.

Conocidas las características del ARr, se evaluaron las características físicas, químicas y microbiológicas de los 12 lotes piloto del IFA D004 obtenidos a partir de los lotes de aceite evaluados anteriormente, todos los cuales además, fueron farmacológicamente activos. Las determinaciones realizadas permitieron describirlo como un líquido aceitoso de color amarillo-naranja a pardo-verdoso y olor característico, con densidad relativa entre 0,866 y 0,907 g/mL; índice de refracción entre 1,446 y 1,456; de saponificación entre 194,2 y 232,8; de acidez entre 328,0 y 417,0 y de yodo entre 52,3 y 60,1; con un contenido de material insaponificable entre 1,5 y 7,3 %; de sodio ≤ 2500 ppm; de potasio ≤ 350 ppm y pérdidas por secado entre

0,4 y 2,7 %; estando compuesto principalmente por los AG caprílico (0,2 – 1,0 %), cáprico (0,3 - 1,0 %), láurico (15,1 – 31,0 %), mirístico (8,8 – 12,4 %), palmitoleico ($\leq 0,6$ %), palmítico (7,5 – 13,0 %), oleico (25,4 – 43,4 %), linoleico (7,9 – 15,7 %), linolénico (0,1 – 0,3 %) y esteárico (1,7 – 3,2 %), para un contenido total de AG entre 85,8 y 95,4 %; además de cumplir con los contenidos exigidos de hexano residual (< 290 ppm), metales pesados (< 10 ppm), y microorganismos (≤ 1000 bacterias/g y ≤ 100 hongos/g, ausencia de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. y *C. albicans*). Los resultados anteriores aportaron un valioso conocimiento inicial sobre los parámetros que caracterizan este nuevo IFA, obtenido a escala piloto y con demostrada eficacia farmacológica, y sirven de base para el establecimiento de sus especificaciones de calidad.

Además de las principales características físicas, químicas y microbiológicas del D004, incluida su composición de AG, principales responsables del efecto farmacológico, se determinaron otros componentes minoritarios de este IFA, a partir del aislamiento de las fracciones de compuestos insaponificables y volátiles. La fracción insaponificable, compuesta mayoritariamente por alcoholes grasos, esteroides y triterpenos, constituye aproximadamente el 4 % de este IFA; mientras que su fracción volátil, obtenida por hidrodestilación, constituye un 1,2 % y está compuesta principalmente por ácidos.

Con vistas a determinar el material de envase más adecuado para almacenar al D004, se estudió su estabilidad en diferentes envases a 40 °C y 75 % HR. Esto permitió seleccionar el vidrio ámbar como material de envase, con el que se observó un tiempo de vida útil (12 meses) mayor que en tereftalato de polietileno y polietileno de alta densidad (6 y 9 meses, respectivamente). Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se estudió la estabilidad a largo plazo en frascos de vidrio ámbar, en las condiciones de la zona climática IV (30 °C y 70 % HR), en las que se observó un tiempo de vida útil de 24 meses.

La tesis consta de una introducción, en la que se exponen la hipótesis y los objetivos del trabajo, así como de siete capítulos. En el primero, se presenta una revisión bibliográfica actualizada que abarca aspectos relacionados con las palmas cubanas, *Serenoa repens*, estrategias empleadas en la búsqueda de nuevas sustancias farmacológicamente activas, validación de métodos analíticos y estudios de estabilidad. A continuación, en tres capítulos se abordan los estudios relacionados con el empleo de los frutos de *R. regia* como material vegetal de partida para la obtención del D004, los del aceite de *R. regia* como producto intermedio y los del ingrediente activo D004. Cada uno de estos capítulos consta de una breve introducción, materiales y métodos, resultados y discusión y conclusiones parciales. El quinto capítulo consiste en un análisis integral de los resultados, mientras que el sexto comprende las conclusiones generales y recomendaciones. El séptimo recoge las referencias bibliográficas en 144 citas y seguidamente, se muestran los anexos, las publicaciones relacionadas con el tema de tesis y los trabajos presentados en eventos científicos.

Las determinaciones analíticas presentadas en la tesis, que se realizaron por primera vez, abarcaron frutos de varias especies, incluidos los de *R. regia* como material de partida, el MVPSM y el ARr como productos intermedios y el producto final D004, contribuyeron de forma significativa al desarrollo de un nuevo IFA, obtenido de una fuente natural no empleada con anterioridad en la industria farmacéutica, el cual presenta potencialidades como medicamento para el manejo de la HPB. El presente trabajo posibilitó además, la concesión de la patente de invención del D004 en 33 países hasta el presente (Cuba, Australia, Japón, Canadá, Corea del Sur, China, Sudáfrica y 15 países de Europa, entre otros) y la publicación de 21 artículos científicos, cinco de ellos, en revistas de alto factor de impacto; todo lo cual avala la novedad y el carácter inventivo de este trabajo. El D004 se encuentra actualmente en la fase III de ensayos clínicos, aprobados por el Centro para el Control de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos, en los que su administración a pacientes con HPB se lleva a cabo en forma de cápsulas blandas (360 mg de D004/cápsula).