

COMUNICACIÓN CORTA

Estudios de estabilidad del aceite del fruto entero de la palma real cubana (*Roystonea regia*)

Eduardo A. Rodríguez Leyes, Roxana C. Sierra Pérez, Víctor L. González Canavaciolo y David Marrero Delange.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 198 entre Calles 19 y 21, Reparto Atabey, Playa, Fax (537) 33 6837. Correo electrónico: eduardo.rodriguez@cnic.edu.cu.

Recibido: 20 de junio de 2008. Aceptado: 20 de agosto de 2008.

Palabras clave: aceite, ácidos grasos, estabilidad, cromatografía de gases, *Roystonea regia*, validación.
Key words: oil, fatty acids, stability, gas chromatography, *Roystonea regia*, validation.

En décadas anteriores, se intentó desarrollar la producción de aceite a partir de la semilla de la palma real (*Roystonea regia*), proyecto que fue abandonado por dificultades técnicas en el despulpado del fruto.¹ Actualmente, el desarrollo del nuevo ingrediente activo D004, efectivo en el tratamiento de la hiperplasia prostática en modelos experimentales, ha impulsado a que se retome la obtención de aceite de esta planta, pero a partir del fruto entero.^{2,3} Dicho aceite, de color pardo oscuro, está compuesto fundamentalmente por glicéridos de ácidos grasos (AG) entre 8 y 18 átomos de carbono.⁴ Los aceites presentan determinados compuestos como los AG insaturados que son susceptibles a experimentar degradación, proceso que puede verse influenciado por las condiciones ambientales y por la presencia de sustancias pro- o antioxidantes.⁵ Hasta la fecha, no existen referencias con respecto al tiempo de vida útil del aceite de los frutos de esta palma, lo que motivó el inicio de sus estudios de estabilidad con la determinación de algunos parámetros físicos y microbiológicos, y la validación de un método analítico por cromatografía de gases (CG) que permitiera la determinación de su contenido de AG, compuestos que tienen el mayor peso en la actividad biológica del D004.

Dicho método se basó en un procedimiento oficial del *Institute for Nutraceutical Advancement*⁶ con algunas modificaciones, según se describe a continuación. Para preparar las muestras se pesaron con exactitud alrededor de 12 mg del patrón interno ($C_{13:0}$) y 150 mg de aceite. Se adicionaron 5 mL de cloruro de acetilo al 10 % en metanol, se cerró el tubo de ensayos y se calentó a 85 °C durante 2 h, con agitación ocasional. Se dejó enfriar y se añadieron 4 mL de n-hexano y 4 mL de agua destilada. Se agitó en zaranda (15 min), se dejó reposar y se extrajo una alícuota de 3 mL de la fase orgánica hacia otro tubo de ensayos, en el que se añadieron 4 mL de n-hexano y 4 mL de NaOH 1 mol/L en metanol. Se cerró y se agitó en zaranda (15 min). Se dejó reposar y se extrajo una alícuota de 4 mL hacia un vial, de donde se tomó 1 μ L para el análisis cromatográfico. La cuantificación de los AG se llevó a cabo por el método del patrón interno,⁷ para ello se empleó un cromatógrafo de gases GC-14A (SHIMADZU, Japón), acoplado a sistema

de cómputo, con detector de ionización por llama y una columna capilar BPX-5, (30 m X 0,53 mm d.i. y 1,5 μ m de película, SGE, Australia) en un programa de 120 a 320 °C, a 10 °C/min con 2 min isotérmico a la temperatura final. El flujo de gas portador (H_2) fue 8,18 mL/min, el detector y el inyector se utilizaron a 320 °C. Los patrones de AG (Sigma, USA) y los demás reactivos y disolventes (Merck, Alemania) fueron puros para análisis. Se utilizó una disolución de referencia de AG ($C_{10:0}$ - $C_{18:0}$) de 10,19 mg/mL (DRA).

El método mostró ser específico, sin interferencias entre los AG de interés y el patrón interno y sin la aparición de nuevas señales en los cromatogramas de muestras sometidas a condiciones drásticas que favorecieran la degradación. Para esto se tuvo en cuenta un procedimiento general descrito:⁸ oxidación (H_2O_2 al 30 %, 25 °C, 24 h), fotólisis (luz UV 254 nm, 25 °C, siete días) y termólisis (80 °C, siete días). En todos los casos, se comprobó la limpieza de las señales por CG acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Se demostró que el método era lineal y sin sesgo entre el 60 y el 130 % de la masa nominal (cinco puntos, $n = 3$). La ecuación de regresión fue: $y = (0,897 \pm 0,012) x - (1,572 \pm 1,918)$, con un coeficiente de correlación ($r = 0,999\ 7$) y coeficientes de variación de los factores de respuesta ($CV_f = 0,610\ 8\ %$) y de la pendiente ($CV_b = 0,629\ 0$) que cumplieron con los límites de aceptación (0,99; 5 y 2 % respectivamente). La exactitud fue probada por el método de adición de patrón ($n = 6$) a la concentración nominal, sin diferencias significativas entre el recobrado promedio y el 100 %, con $t_{exp.}$ (1,69) inferior a la $t_{tab.}$ (2,57) para un 95 % de confiabilidad. Los CV del estudio de repetibilidad (un técnico, un día, $n = 9$) variaron de la forma esperada, con la mayor variabilidad para los AG minoritarios y un $CV = 1,04\ %$ para el total. En el estudio de la precisión intermedia (dos técnicos, tres días, $n = 9$ cada uno), tanto los CV individuales como el total (1,04, 0,96 y 0,99 % respectivamente) fueron inferiores al 2 %, por lo que el método es preciso. De acuerdo con los resultados anteriores, el método puede considerarse validado según los criterios actuales de la industria farmacéutica.⁹⁻¹²

Se llevaron a cabo cuatro estudios de estabilidad. En el primero, realizado en las condiciones de estrés des-

critas en el estudio de especificidad, se empleó un lote, al que se le determinó la variación en el contenido de AG. Se apreció que el contenido inicial de AG (87,3 %) no se afectó en condiciones de oxidación (87,8 %), lo que pudo deberse a que este aceite contiene antioxidantes naturales como tocoferoles y compuestos relacionados (confirmado por cromatografía de capa delgada), los cuales pueden haber evitado la oxidación de los AG insaturados presentes. Sin embargo, en condiciones de termólisis y fundamentalmente de fotólisis, sí disminuyó el contenido de AG (84,0 y 81,6 %, respectivamente). Esta degradación pudo haberse motivado por la destrucción de las sustancias antioxidantes presentes originalmente en estas muestras, debido a la influencia de la luz y el calor que recibieron durante el ensayo.⁵ No obstante, se debe señalar que los resultados de estos estudios sólo dan una medida de los factores que más pudieran afectar a este ingrediente activo, siendo los estudios definitivos los de estabilidad a largo plazo.

En los tres estudios restantes: acelerado [(40 ± 2) °C y (75 ± 5) % de HR, 1 año]; a largo plazo [(30 ± 2) °C y (70 ± 5) % de HR, 2 años] y en refrigeración [(10 ± 3) °C y (40 ± 5) % de HR, 2 años] se estudiaron tres lotes, envasados en frascos de vidrio transparente de 50 mL de capacidad, con tapa de goma y sello de aluminio. Los muestreos se realizaron en los tiempos siguientes: 0, 3, 6, 9 y 12 meses para el estudio acelerado, y 0, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses para los estudios a largo plazo, durante los cuales siempre se tomó de forma aleatoria un frasco nuevo de cada lote. En los tres estudios se determinó además del contenido de AG, las características organolépticas, la densidad relativa y el índice de refracción, mientras en los dos últimos, se determinó también el contenido microbiológico. Durante el tiempo en que se realizaron estos ensayos se encontró que no hubo variaciones significativas en los parámetros evaluados según la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas ($p = 0,05$). La densidad relativa a 25 °C se mantuvo entre 0,907 9 y 0,874 2 g/mL, el índice de refracción a 25 °C entre 1,461 y 1,452. Las características organolépticas (líquido oleoso de color pardo oscuro) y el contenido microbiológico ($\leq 1\ 000$ bacterias/g, ≤ 100 hongos/g, ausencia de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp. y *Candida albicans*)¹³ se correspondieron en todos los casos con lo reportado para el inicio de los estudios. Los contenidos individuales y totales de AG observados al inicio (Tabla 1), tampoco variaron significativamente a lo largo de los estudios, siendo similares al reportado para los extractos lipídicos de otra palmácea: la *Serenoa repens*.¹⁴ Teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos, el aceite obtenido de los frutos enteros de *R. regia*, envasado en frascos de vidrio transparente con tapa de goma y sello de aluminio, mantiene su estabilidad química y microbiológica al menos durante dos años, tanto en condiciones de refrigeración como en la zona climática IV, a la que Cuba pertenece.

BIBLIOGRAFÍA

- Ruebens C. Industrialización del palmiche en Cuba. **Industria Alimentaria**, **1**, 8-25, 1968.
- Carbajal D. Molina V., Mas R. and Arruzazabala M.L. Therapeutic effect of D-004 a lipid extract from *Roystonea regia* fruits on prostate hyperplasia induced in rats. **Drugs Exp. Clin. Res.**, **31**, 193-197, 2005.
- Laguna A., Rodríguez E., Más R., Carvajal D., Arruzazabala L., Molina V. y González V., Extracto obtenido a partir de frutos maduros de *R. regia* utilizado contra la hiperplasia prostática y la prostatitis. Patente de invención No. 23256, Cuba, noviembre de 2007.
- Rodríguez E., González V., Marrero D., Sgambelluri A. and Adames Y. Fatty acid composition and oil yield in fruits of five *Arecaceae* species grown in Cuba. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **84**, 765-767, 2007.
- Litwinienko G. and Kasprzycka T. Study on the autoxidation kinetics of fats components by differential scanning calorimetric. Unsaturated fatty acids and their esters. **Ind. Eng. Chem. Res.**, **39**, 13-17, 2000.
- Institute for Nutraceutical Advancement (INA) Method 108.003. Fatty Acid Content in Saw Palmetto by GC. <http://www.nsf.org/business/ina/fattyacids.asp>. (Consultado: 15 de mayo de 2008.)
- Novák J. Quantitative Analysis by Gas Chromatography Part. 6 (J. Cazes Ed.) Second Edition, Marcel Dekker, New York, 79-134, 1988.
- FLSON Standard Procedure: Protocol for the Validation of Analytical Methods, CHSP 0152Q, U.K., 1991.
- Castro M., Gascón S., Pujol M., Sans J. and Vicente L. Validation of analytical methods; Spanish Association of the Industry Pharmacists, Catalan Section, Edited under HP license, 1989.
- International Conference of Harmonization. Guideline on Validation of Analytical Procedures. Definitions and Terminology. March 1st, 1995.
- Green C. A step-by-step approach to establishing a method validation program. **J. Validation Technology**, **6**, 622-633, 2000.
- Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos de Cuba. Regulación No. 41-2007 "Validación de métodos analíticos", 2007.
- The United States Pharmacopoeia 27 and National Formulary 22 (USP27-NF22), Supplement 1 (Monograph on CD-ROM). The United States Pharmacopoeial Convention, Inc. USA, 2004.
- Bombardelli E. and Morazzoni P. *Serenoa repens* (Bartram) J.K. Small. **Fitoterapia**, **2**, 99-113, 1997.

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos (%) determinado al inicio de los estudios.

	281103	Lote 191203 Contenido (%)	180104
Ácido			
C _{8:0}	0,7	0,9	0,8
C _{10:0}	0,7	0,9	0,8
C _{12:0}	20,5	22,7	23,1
C _{14:0}	7,8	8,0	8,4
C _{16:1}	0,5	0,7	0,6
C _{16:0}	11,9	13,1	13,2
C _{18:1} ^a	38,4	38,6	41,8
C _{18:0}	2,4	2,4	2,6
Total	82,9	87,3	91,3

^a Incluye además los ácidos C_{18:2} y C_{18:3}.