

PRODUCTOS NATURALES

Estudios organolépticos, fisicoquímicos, microbiológicos e interacción con excipientes farmacéuticos de un extracto purificado de cera de *Apis mellifera***Organoleptic, physicochemical and microbiological studies and its interaction with pharmaceutical excipients of a purified extract from *Apis mellifera* wax****Víctor Luis González Canavaciolo^I; Luis Martínez Álvarez^{II}; David Marrero Delange^I; Roxana Caridad Sierra Pérez^{III}**

^IDoctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

^{II}Máster en Química Farmacéutica. Investigador Agregado. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

^{III}Máster en Química Farmacéutica. Investigador Agregado. Centro de Productos Naturales, CNIC. La Habana, Cuba.

RESUMEN

El D-002, ingrediente activo antioxidante extraído de la cera de abejas *Apis mellifera*, fue caracterizado desde el punto de vista físicoquímico, de igual forma se analizó su interacción con excipientes de interés farmacéutico. El D-002 es un polvo fluido inodoro de color blanco a crema, con pérdidas por secado ≤ 1 %; es insoluble en agua y etanol, y muy ligeramente soluble en otros disolventes orgánicos. Su composición, determinada por cromatografía de gases, fue: 1-tetracosanol (6-15 %), 1-hexacosanol (7-20 %), 1-octacosanol (12-20 %), 1-triacontanol (25-35 %) 1-dotriacontanol (18-25 %) y 1-tetratriacontanol ($\leq 7,5$ %), para una pureza ≥ 85 %. Fue estable durante 5 años en la zona climática IV y su análisis por calorimetría diferencial de barrido mostró 2 transiciones de fusión a 59,0 y 81,1 °C sin descomposición, una alta estabilidad térmica hasta 200 °C, así como la ausencia de interacciones con lactosa, almidón, croscarmelosa sódica, polivinil pirrolidona, celulosa microcristalina y estearato de magnesio, lo que posibilita el empleo de estos excipientes en la formulación de las tabletas.

Palabras clave: Calorimetría diferencial de barrido, termogravimetría, *Apis mellifera*,

ABSTRACT

The D002, an antioxidant active ingredient extracted from the *Apis mellifera* bees wax was characterized from the physicochemical point of view analyzing its interaction with excipients of pharmaceutical interest. The D-002 is a creamy white odourless fluid powder with losses by ≤ 1 % dry; it is water and ethanol insoluble

and very slightly soluble in other organic solvents. Its composition, determined by gas chromatography was: 1-tetracosanol (6-15 %), 1-hexacosanol (7-20 %), 1-octacosanol (12-20 %), 1-triacontanol (25-35 %), 1-dotriacontanol (18-25 %) and 1-tetratriacontanol ($\leq 7,5$ %) for ≥ 85 % of purity. It remained stable during 5 years in the IV climatic zone and its analysis by differential scanning calorimetry showed 2 fusion transitions at 59.0 and 81.1 °C. without decomposition, a high thermal stability up to 200 °C, as well as a lack of interactions with lactose, starch, sodium croscarmellose, polyvinylpyrrolidone, microcrystalline cellulose, and magnesium stearate allowing the use of these excipients in tablets formula.

Key words: Scanning differential calorimetry, thermogravimetry analysis, *Apis mellifera*, fatty alcohols.

INTRODUCCION

Los estudios iniciales de caracterización de un nuevo ingrediente activo, así como la determinación de sus posibles interacciones farmacéuticas con diferentes excipientes son aspectos esenciales en el desarrollo de su forma terminada. El Abexol® es un suplemento nutricional desarrollado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC, La Habana, Cuba), que contiene como ingrediente activo al D-002, mezcla de alcoholes grasos purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*), el cual ha mostrado efectos antioxidantes en estudios experimentales y clínicos.¹⁻⁵ Como objetivo del trabajo se planteó la caracterización del D002 y el estudio de su interacción con excipientes farmacéuticos, todo lo cual permitió el desarrollo de su forma terminada.

MÉTODOS

Se determinaron las características organolépticas y las pérdidas por secado en 30 lotes de D-002 para los que se había comprobado previamente la acción farmacológica deseada. Se estudió además la solubilidad de tres de estos lotes en agua, etanol, 1,2-dicloroetano, hexano, acetona y cloroformo. Todas las determinaciones anteriores se realizaron según métodos de la USP 27.⁶

La composición del D-002 se determinó por cromatografía de gases (CG) en los 30 lotes estudiados, empleando al 1-eicosanol como patrón interno y al N-metil, N-trimetilsilil trifluoroacetamida como agente derivatizante (Sigma, EUA) mediante un método validado.⁷ Para ello se empleó un cromatógrafo de gases 6890N con detector de ionización por llama (Agilent, EUA), equipado con una columna HP-5 (30 m x 0,25 μ m d.i. y 0,25 mm de espesor de película, Agilent, EUA) en un programa de 70 °C (1 min) hasta 200 °C, a 30 °C/min, y de 200 °C hasta 320 °C (10 min) a 8 °C/min. El detector y el inyector se mantuvieron a 320 °C, el volumen de inyección fue 0,5 μ L en modo splitless, y el flujo del gas portador (H_2) fue 1 mL/min. La identidad de los componentes individuales se determinó mediante el empleo de un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector selectivo de masas 5975B (Agilent, EUA) con una columna HP-5MS de iguales dimensiones y en un programa de temperatura, volumen de inyección y flujo de gas portador igual al descrito con anterioridad, con el empleo de He en lugar de H_2 como gas portador. Se mantuvo el inyector a 320 °C, la interfase a 280 °C, la fuente de ionización a

250 °C, y el cuadrupolo a 150 °C. La ionización fue por impacto electrónico a 70 eV y se adquirió de 40 a 800 m/z.

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada a 40 ± 2 °C y 75 ± 5 % de humedad relativa (HR), así como un estudio de estabilidad de estante en las condiciones de la zona climática IV (30 ± 2 °C) y (70 ± 5 %) HR con tres lotes industriales. En ambos casos se siguieron las recomendaciones de la Conferencia Internacional sobre armonización⁸ y el análisis estadístico incluyó la prueba de χ^2 para comprobar la normalidad, la prueba de Fisher para el análisis de varianza y la comparación de medias por la prueba t de Student para muestras dependientes ($p= 0,05$).

Para determinar la estabilidad térmica, las transiciones características y las posibles interacciones del D002 con los excipientes elegidos para elaborar la forma terminada, se realizó el análisis por termogravimetría (TG) y calorimetría diferencial de barrido (CDB) con el uso de un equipo Mettler TA 3000 acoplado a una celda térmica DSC-20 (Greifensee, Suiza). Se empleó el lote 030011006 de D002 ingrediente activo (CNIC, Cuba) y los excipientes: lactosa, almidón, croscarmelosa sódica, polivinil pirrolidona, celulosa microcristalina y estearato de magnesio, todos de calidad farmacéutica. Para estudiar las interacciones farmacéuticas se mezcló durante 10 min el D002 con cada excipiente a una relación masa/masa de 1:1, se trituraron dichas mezclas y se tamizaron a 300 μm . Previo al análisis, las muestras se calentaron a 80 °C durante 1 h, se secaron en un horno al vacío durante 5 h y se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente (25 °C). Las muestras (5-7 mg) se colocaron en un crisol de aluminio (40 μL) y se llevaron de 30 a 350 °C a 10 °C/min. El calorímetro fue calibrado con un patrón de indio y los análisis se realizaron bajo un flujo de 30 mL/min de N_2 .

RESULTADOS

Se determinó que el D-002 es un polvo fluido inodoro de color blanco a crema, con pérdidas por desecación ≤ 1 % (0,54 % con $\text{DE}= 0,18$); resultó insoluble en agua y etanol ($> 12\ 000$ mL/g) y muy ligeramente soluble en 1,2-dicloroetano, hexano, acetona y cloroformo ($> 3\ 000$ mL/g). Los componentes individuales del D-002, identificados por los espectros de masas de sus derivados trimetilsilil, fueron los alcoholes alifáticos de cadena par de átomos de carbono entre C_{24} y C_{34} . Los contenidos porcentuales en que estos se encuentran, determinados por CG mediante el empleo de un patrón interno, se pueden resumir en los siguientes intervalos: 1-tetracosanol (6-15 %), 1-hexacosanol (7-20 %), 1-octacosanol (12-20 %), 1-triacontanol (25-35 %) 1-dotriacontanol (18-25 %) y 1-tetratriacontanol ($\leq 7,5$ %), para un contenido total de alcoholes (pureza del ingrediente activo) ≥ 85 %. Su contenido microbiológico estuvo dado por $\leq 1\ 000$ bacterias/g, ≤ 100 hongos/g, y ausencia de *E. coli*, *E. aureus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *C. albicans*.

Durante los 6 meses del estudio de estabilidad acelerada no ocurrieron cambios significativos en las propiedades organolépticas, en las pérdidas por secado, ni en el contenido microbiológico, parámetros que se mantuvieron de la forma anteriormente descrita. El contenido de alcoholes grasos (87,8-89,1 %) tampoco varió significativamente durante todo el estudio ($p < 0,05$). La estabilidad también se demostró a través del estudio a largo plazo en las condiciones de la zona climática IV, ya que tampoco se observaron variaciones significativas ($p < 0,05$) durante 5 años en los parámetros estudiados.

En la curva obtenida por CDB para el D-002 (fig. 1) se observaron dos transiciones de fusión endotérmicas a 59,0 y 81,1 °C, con energías de 276,76 y 452,48 J/g, respectivamente. Una tercera transición, exotérmica, se apreció a temperaturas

superiores a los 200 °C, con una energía de activación de 4 270,6 J/g. Los análisis del D-002 por TG demostraron que no ocurre pérdida de masa entre 35 y 200 °C.

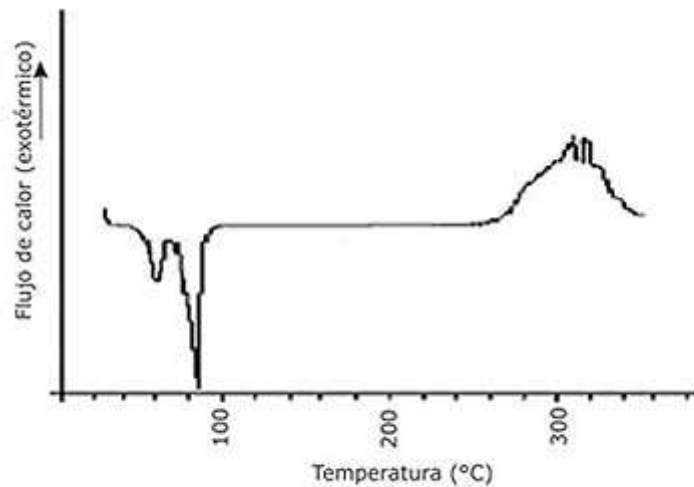


Fig. 1. Termograma del D-002 por caloría diferencial de barrido.

En las curvas obtenidas por CDB para las mezclas binarias de D002 con cada excipiente (fig. 2) no se observó ninguna nueva transición además de las dos correspondientes al D-002 anteriormente comentadas, y las propias de los ex

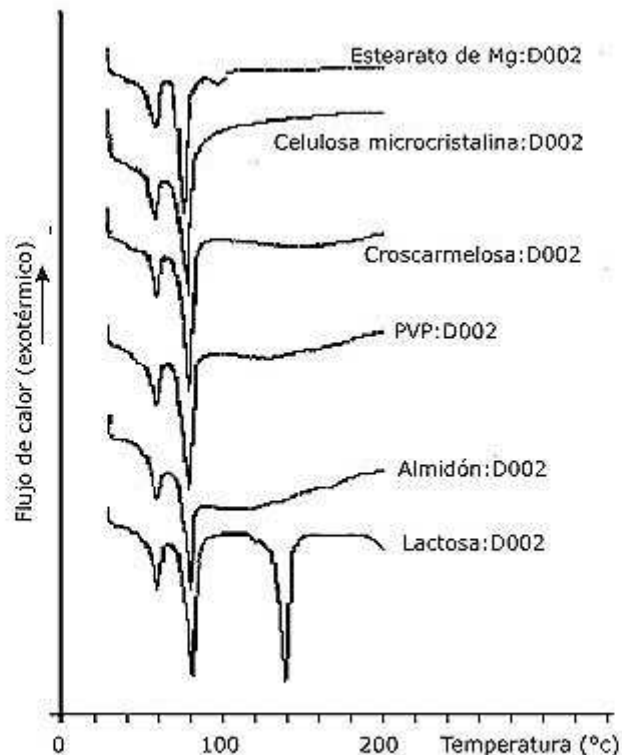


Fig. 2. Termogramas de las mezclas excipientes: D-002 por caloría diferencial de barrido. cipientes, como la observada para la lactosa.

DISCUSIÓN

Los estudios realizados permitieron la caracterización inicial del ingrediente activo D-002 en cuanto a sus propiedades organolépticas, pérdidas por secado, solubilidad y composición. Esta última estuvo dada por una mezcla de los alcoholes alifáticos superiores anteriormente mencionados, cuya naturaleza química explica la alta estabilidad observada para el D-002, tanto en el estudio acelerado como en las condiciones de estante de la zona climática a la que pertenece Cuba. Al no haberse detectado pérdida de masa entre 35 y 200 °C en los análisis realizados por TG, se confirmó que las transiciones endotérmicas detectadas a 59,0 y 81,1 °C se relacionan con procesos de fusión, en los que no se descompone la sustancia en estudio, mientras que la transición exotérmica observada por encima de los 200 °C se debió a un proceso de descomposición térmica. La alta energía de activación calculada para este proceso confirma la elevada estabilidad térmica del D-002, el cual se funde sin descomposición y se mantiene estable a temperaturas tan altas como 200 °C.

Las determinaciones anteriores dieron paso al desarrollo de la forma terminada, y como tal fue seleccionada la tableta, por sus ventajas en cuanto a la exactitud de su dosis, su buena estabilidad física y química, la escasa manipulación que requieren y la buena adhesión de los sujetos al tratamiento cuando se emplea esta forma farmacéutica en comparación con otras. Experiencias previas en el desarrollo de tabletas de policosanol ingrediente activo,⁹ también compuesto por una mezcla de alcoholes superiores, facilitó la elección de los excipientes siguientes: lactosa como diluyente, almidón y croscarmelosa sódica como desintegrantes, polivinil pirrolidona como aglutinante, celulosa microcristalina 101 como granulante y estearato de magnesio como lubricante. Para determinar posibles incompatibilidades del D-002 con dichos excipientes se empleó el análisis por CDB, el cual permitió realizar este tipo de estudio en breve tiempo con respecto a otros métodos clásicos. Las curvas obtenidas por CDB para las mezclas de D-002 con cada excipiente demostraron la ausencia de interacciones físicas y químicas entre ellos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el policosanol⁹ e indican la ausencia de incompatibilidades farmacéuticas entre el ingrediente activo y los excipientes estudiados, por lo que estos pueden ser empleados en la formulación de las tabletas de D-002.

Se establecieron en este estudio las características organolépticas, fisico-químicas, la composición, el contenido microbiológico y la estabilidad del ingrediente activo D002. De igual forma se estudió su posible interacción con excipientes de interés farmacéutico, todo lo cual posibilitó el desarrollo posterior de su forma terminada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Molina V, Valdés S, Carbajal D, Arruzazabala ML, Menendez R, Más R. Antioxidant effects of D-002 on gastric mucosa of rats with injury induced experimentally. *J Med Food*. 2001;4:79-84.
2. Mendoza S, Noa M, Perez Y, Más R. Preventive effect of D-002, a mixture of long-chain alcohols from beeswax, on the liver damage induced with CCl₄ in rats. *J Med Food*. 2007;10:379-83.
3. Menéndez R, Mas R, Amor AM, Pérez Y, González RM, Fernández JC, et al. Antioxidant effects of D-002 on the *in vitro* susceptibility in healthy volunteers. *Arch Med Res*. 2001;32:436_41.

4. Menéndez R, Mas R, Illnait J, Pérez J, Amor AM, Fernández JC, et al. Effects of D-002 on lipid peroxidation in older subjects. *J Med Food*. 2001;4:71-7.
5. López E, Illnait J, Molina V, Oyarzabal A, Fernández L, Pérez Y, et al. Effects of D-002 (beeswax alcohols) on lipid peroxidation in middle-aged and older subjects. *Latin Am J Pharm*. 2008;27:695-703.
6. González V, Marrero D, Sierra R, Velázquez C, Vicente R. Nuevo método por CG capilar para el análisis del ingrediente activo D002. *Rev CENIC C Quim*. 2008;39(3):123-4.
7. The United States Pharmacopoeia 27 and National Formulary 22 (USP 27_NF 22), Supplement 1 [CD-ROM]. Washington: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc; 2004.
8. International Conference on Harmonization. ICH Q1A (R) 2736/99: Stability testing guidelines: Stability testing of new drug substances and products, London: EMEA; 2000.
9. Cabrera L, Uribarri E, Laguna A, Sierra R, Madreros D, González M, González VL. Study of interaction between policosanol and excipients. *Bolletino Químico Farmacéutico*. 2002;141(2):138-42.

Recibido: 8 de abril de 2010.

Aprobado: 17 de mayo de 2010.

Dr. *Víctor Luis González Canavaciolo*. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: victor.gonzalez@cnic.edu.cu