

Estudios de Preformulación de un Fitomedicamento Tópico Antiinflamatorio con Base en Fracciones Activas de Flores y Hojas de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz empleando Modelos Analíticos Biológicos

Germán Eduardo MATIZ ^{1*}, Paola Andrea CÁRDENAS ² & Javier RINCÓN V. ²

¹ Universidad de Cartagena, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Cartagena de Indias, Bolívar, Colombia

² Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Ciudad Universitaria, Edificio 450, Bogotá D.C., Colombia

RESUMEN. Las flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz (Caesalpinaceae) se emplean en medicina popular como antiinflamatorios. Esta acción se comprobó experimentalmente empleando el modelo de edema auricular en oreja de ratón inducido por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol), encontrándose que las fracciones clorofórmicas de ambos órganos responden mayoritariamente por dicha actividad, alcanzando niveles de inhibición del 80%. Posteriormente se diseñó una loción para uso tópico, desarrollándose estudios de estabilidad acelerados a un sólo punto empleando el mismo modelo biológico como método analítico, demostrándose que la actividad del fitopreparado se puede garantizar por más de 24 meses a temperatura de almacenamiento de 25 °C.

SUMMARY. "Preformulation Studies of an Antiinflammatory Topic Phytomedicine Based on Active Fractions of Flowers and Leaves of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz Using Biological Analytical Models". Flowers and leaves of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz (Caesalpinaceae), are used in folk medicine as antiinflammatories. Experimentally was found that chloroformic fractions of both organs are responsible for such activity, reaching inhibition levels about 80% in a model of TPA-induced ear edema. A topic lotion was developed, performing stability studies using the same biological model as analytical method. The phytomedicine remains active for at least 24 months stored at 25 °C.

INTRODUCCIÓN

La preformulación de fitomedicamentos tiene muchos elementos en común con la de medicamentos convencionales. No obstante, algunos de estos elementos son difíciles de homologar, como es el caso de los estudios de estabilidad, debido a la compleja composición que caracteriza a dichos preparados. Para el desarrollo de estos estudios, el primer paso es disponer de una metodología analítica validada, pero identificar un trazador químico asociado a la estabilidad y cuantificable por métodos instrumentales resulta una labor compleja, costosa y demorada. Debido al creciente mercado y al redescubrimiento de los productos naturales, se hace necesario atender la demanda con productos que garanticen seguridad y eficacia de manera económica. Por esta razón, este trabajo ejemplifica el uso de modelos biológicos durante la preformulación de fitopreparados al emplearlos como ensayos

analíticos durante el desarrollo de fitopreparados, que garanticen la calidad terapéutica de productos comerciales.

Caesalpinia pulcherrima (L.) Swartz, es un arbusto originario del trópico americano, pero distribuido también ampliamente en la región tropical de África y Asia, muy utilizado como planta ornamental ¹. Estudios etnobotánicos realizados al sur del Departamento de Cundinamarca, Colombia, por los autores del presente artículo, encontraron que una maceración de las flores en alcohol antiséptico (70%) se emplea por los pobladores para el tratamiento de la artritis reumatoidea, lo que motivó el interés de evaluarla científicamente dados los resultados positivos declarados. En la India y la China a esta planta se le conoce por esta y otras propiedades medicinales. Kumar *et al.* ² estudiaron actividades antiinflamatoria y analgésica de extractos en éter de petróleo de hojas de esta planta, encuentran-

PALABRAS CLAVE: *Caesalpinia pulcherrima*, Estabilidad, Fitomedicamento, Modelos biológicos.

KEY WORDS: Biological models, *Caesalpinia pulcherrima*, Phytomedicine, Stability.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: gematizm@unal.edu.co.

do que fueron eficaces en el ensayo de inhibición de formación de granuloma por disco de algodón y en la inflamación auricular inducida por etil-fenil-propionato. Rao *et al.*³ reportaron la actividad antiinflamatoria de los flavonoides 5,7-dimetoxiflavanona, 5,7-dimetoxi-3',4'-metilendioxi-flavanona, isobonducelina, 2'-hidroxi-2,3,4',6'-tetrametoxichalcona y bonducelina. Padma *et al.*⁴ evaluaron una interesante actividad antioxidante tanto enzimática como no enzimática presente en las flores de esta especie, lo que podría significar un valor potencial de las mismas en procesos biológicos en los que estén involucrados eventos oxidativos, como la inflamación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Flores (CPF) y hojas (CPH) de *C. pulcherrima* fueron recolectadas en la misma región donde se reportó su uso (Sur del Departamento de Cundinamarca). La especie fue identificada en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia con el voucher COL-493856. El material vegetal se secó, pulverizó y acondicionó para extracción.

Reactivos y Solventes

13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA), indometacina y carboxi metil celulosa sódica de mediana viscosidad se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hidroxi-propil-metil-celulosa (HPMC, Methocel) K100M de Colorcon Ltd, UK. Eter de petróleo, cloroformo y metanol de Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NY, USA). Acetona y alcohol isopropílico de Merck KGaA. (Darmstadt, Alemania).

Animales

Ratones ICR, machos y hembras de 10-12 semanas de vida y 25-35 g de peso. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo (luz entre las 06:00 y las 18:00 horas), con acceso *ad libitum* de agua y alimento. Durante los experimentos los animales fueron tratados de acuerdo a lineamientos éticos institucionales, nacionales e internacionales de cuidado y manejo de animales de laboratorio.

Actividad Antiinflamatoria

Edema Auricular inducido por TPA

Para los ensayo se usaron ratones distribuidos en cajas en grupos de 10 animales. Las cajas correspondían a control (TPA), patrón positivo (indometacina) y extractos o fracciones de flores

y hojas de *C. pulcherrima* a evaluar, de acuerdo con los procedimientos descritos por Young⁵ y Lapa⁶. Todas las aplicaciones se realizaron en la oreja derecha. A los animales control, se les aplicó únicamente TPA, 2,5 µg disuelto en 20 µL acetona, 10 µL en cada lado de la oreja. A los animales patrón, se les aplicó 500 µg de indometacina disuelta en 20 µL de acetona, 10 µL en cada lado de la oreja e inmediatamente la misma dosis de TPA suministrada al grupo control. A los animales problema, se les aplicó 1000 µg de los extractos disueltos en 20 µL de acetona (10 µL a cada lado), mas la misma dosis de TPA del grupo control. Cuatro horas después de la aplicación de los tratamientos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Con la ayuda de un sacabocados, se retiraron secciones circulares de las orejas derecha (tratada) e izquierda (no tratada), que se pesaron en una balanza analítica Sartorius BP 221S. Del peso neto de la oreja tratada se restó el peso de su respectiva oreja no tratada, para determinar el cambio de peso debido a la inflamación (edema). El porcentaje de inhibición de la inflamación se obtuvo por la Ecuación 1, donde I_c corresponde a la proporción de la inflamación media del grupo control e I_t a la proporción de la inflamación de cada animal en cada grupo tratamiento.

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{I_c - I_t}{I_c} * 100 \quad [1]$$

Análisis de Datos

Los datos experimentales se presentan como la Media ± Error Estándar de la Media (ESM) del porcentaje de inhibición de la inflamación. El análisis se complementa usando ANOVA de una vía seguido de análisis de Dunnett para evaluar la significancia de las diferencias de los tratamientos frente al control, o del análisis de Tukey, para evaluar diferencias entre tratamientos⁷. Las diferencias significativas de expresan como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

RESULTADOS

Evaluación Actividad Preliminar

Los extractos etanólicos totales se obtuvieron por maceración tanto de hojas como de flores para evaluar y confirmar su actividad antiinflamatoria. Los resultados fueron positivos, pues se encontraron niveles de protección del 58,94 y 39,03% respectivamente (Tabla 1).

A continuación se obtuvieron por maceración las fracciones en éter de petróleo (CPF-EP, CPH-EP), clorofórmicas (CPF-CHCl₃, CPH-

Tratamiento	Dosis mg/oreja	% Inhibición ± ESM	Edema (mg)
Control	–		19,59
Indometacina	0,5	63,95 ± 5,06**	6,59
Extracto Etanólico Total Hojas	1,0	58,94 ± 4,95*	7,72
Extracto Etanólico Total Flores	1,0	39,03 ± 8,67*	11,23

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria preliminar de los extractos etanólicos totales de flores y hojas de *C. pulcherrima*. ** $p < 0,01$ comparado con el control (ANOVA seguido de test de Dunnett). Cada valor representa la media ± error estándar de la media de diez animales.

CHCl₃), metanólicas (CPF-MeOH, CPH-MeOH) y acuosas (CPF-Liof, CPH-Liof) empleando un solvente a la vez hasta agotamiento del material y pasando al siguiente de mayor polaridad. Durante la concentración de los extractos CPF-EP Y CPF-MeOH, se produjeron unos precipitados, que se denominaron CPF-PEP Y CPF-PMeOH. Los extractos orgánicos se concentraron mediante un evaporador rotatorio a vacío trabajando a temperatura no mayor a 35 °C. Los extractos acuosos fueron liofilizados. Todas las fracciones (incluyendo los precipitados) se evaluaron empleando el mismo modelo murino de edema auricular inducido por TPA, encontrándose que las fracciones CPF-CHCl₃, CPF-PEP y CPH-CHCl₃, no sólo mantenían la actividad biológica ya confirmada, sino que esta se elevaba a niveles del 91,52, 93,94 y 76,52%, respectivamente (Tabla 2).

Determinación de Dosis y Vía de Administración

Para determinar si tales fracciones activas respondían a un esquema dosis-respuesta, se modificó el modelo biológico empleado, modificando la concentración de la solución aplicada a los animales problema, esto es, dosis de 0,06, 0,3, 0,6 y 1,0 mg/oreja disueltas en acetona. Los resultados se presentan en la Tabla 3. La dosis más baja evaluada, 0,06 mg/oreja no mostró actividad para ninguna de las fracciones. Para las otras dosis, se encontraron notables niveles de protección del orden del 80% desde concentraciones tan bajas como 0,3 mg/oreja para las fracciones CPF-CHCl₃ y CPF-PEP, y 0,6 mg/oreja para CPH-CHCl₃. Una posología de 0,3 mg en 20 mL de solución equivale a una concentración de 1,5%, y una de 0,6 mg en el mismo volumen a 3,0%. Estas fueron las concentraciones elegidas para continuar con el diseño de los fitome-

Tratamiento	Dosis mg/oreja	% Inhibición ± ESM	Edema (mg)
Control	–		17,93
Indometacina	0,5	72,76 ± 3,45**	8,27
CPF-EP	1,0	24,77 ± 2,21	10,77
CPF-PEP	1,0	93,94 ± 1,97**	1,10
CPF-CHCl ₃	1,0	91,52 ± 1,94**	1,71
CPF-MeOH	1,0	37,45 ± 8,88*	11,44
CPF-PMeOH	1,0	–	21,22
CPF-Liof	1,0	5,69 ± 4,77	14,16
CPH-EP	1,0	19,34 ± 4,46	13,53
CPH-CHCl ₃	1,0	76,52 ± 7,46**	4,77
CPH-MeOH	1,0	16,56 ± 3,76	17,36
CPH-Liof	1,0	–	15,36

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de flores y hojas de *C. pulcherrima*, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparado con el control (ANOVA seguido de test de Dunnett). Cada valor representa la media ± error estándar de la media de diez animales.

Tratamiento	Dosis mg/oreja	% Inhibición ± ESM	Edema (mg)
Control	–		18,04
Indometacina	0,5	69,23 ± 1,50**	6,09
	0,06	–	15,00
CPF-CHCl ₃	0,3	79,51 ± 2,21*	3,34
	0,6	78,30 ± 1,38**	3,64
	1,0	88,65 ± 1,39**	1,97
	0,06	–	16,18
CPH-CHCl ₃	0,3	46,36 ± 3,15**	8,20
	0,6	82,47 ± 1,84**	2,88
	1,0	79,79 ± 3,01**	4,00
	0,06	–	15,25
CPF-PEP	0,3	70,20 ± 2,44**	4,57
	0,6	69,64 ± 3,00**	6,04
	1,0	94,95 ± 1,11**	0,81

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de cuatro dosis de las fracciones CPF-PEP, CPF-CHCl₃ Y CPH-CHCl₃ de *C. pulcherrima*. ** $p < 0,01$ comparado con el control (ANOVA seguido de test de Dunnett). Cada valor representa la media ± error estándar de la media de diez animales.

dicamentos. Habida cuenta que los datos etnofarmacológicos señalaban la vía tópica como la empleada para el tratamiento de la inflamación por artritis y que el modelo murino de inflamación auricular por TPA permitía medir el grado de protección de los preparados, se inició el diseño de una forma farmacéutica para la misma vía.

Preformulación

Dada la nula solubilidad en agua de las fracciones, la forma farmacéutica de elección fue la que permitió el uso de un vehículo orgánico compatible con la piel. Se pensó en un gel de HPMC, empleando isopropanol como vehículo. Para evitar desviaciones en los análisis, se evaluó la actividad inflamatoria intrínseca de este alcohol, encontrándose que no posee ninguna (datos no mostrados), es decir, no posee actividad antiinflamatoria *per se*. A continuación se determinó si el empleo de isopropanol en lugar de acetona modificaba la actividad de los extractos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La fracción CPF-CHCl₃ perdió un 15% de actividad, y la fracción CPH-CHCl₃ un 29% (Tabla 4). Esto indicó que el empleo de isopropanol como vehículo exclusivo no era lo más indicado. A pesar de su marcada actividad la fracción CPF-PEP no se pudo continuar evaluando debido a que la cantidad obtenida fue pequeña. A continuación se evaluaron mezclas binarias de acetona/isopropanol para encontrar el mejor vehículo, encontrando que en la proporción 75/25 no había pérdida de actividad, por tanto era la más conveniente y la que se empleó en el diseño (datos no mostrados). Estos solventes pueden ser empleados como vehículos para formas farmacéuticas externas y simplifican parcialmente el diseño, debido a que por su aroma proporcionan carácter a la preparación y por su actividad antiséptica elimina la necesidad de emplear preservativos adicionales ^{8,9}, además que ambos incrementan la permeabilidad cutánea favoreciendo la absorción ¹⁰.

Tratamiento	Dosis mg/oreja	% Inhibición ± ESM	Edema (mg)
Control	–		20,01
Indometacina	0,5	67,24 ± 5,50**	8,63
CPF-CH en Acetona	1,0	88,92 ± 2,92**	2,44
CPF-CHCl ₃ en Isopropanol	1,0	74,72 ± 6,25**	6,33
CPH-CHCl ₃ en Acetona	1,0	91,64 ± 3,41**	1,44
CPF-CHCl ₃ en Isopropanol	1,0	64,83 ± 2,39**	5,82

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria de CPF-CHCl₃ y CPH-CHCl₃ en acetona e isopropanol. ** $p < 0,01$ comparado con el control (ANOVA seguido de test de Tukey). Cada valor representa la media ± error estándar de la media de diez animales.

El siguiente paso fue evaluar el efecto del agente viscosante en la formulación. Al incorporar hidroxipropil metil celulosa (Methocel® K100M Premium) en la preformulación al 1%, los niveles de actividad de las fracciones se redujeron en más de un 80%, es decir, la biodisponibilidad de los compuestos activos se reduce de manera dramática. Se hizo un ensayo cambiando el methocel (polímero) por una arcilla coloidal. Este cambio implicaba la incorporación de agua a la formulación, al igual que probar con diferentes coadyuvantes como polisorbato 80, glicerina y lauril sulfato de sodio. Ninguna prueba resultó positiva, por lo que se decidió no trabajar con formas farmacéuticas de geles o emulgeles, sino con lociones (CPF-CHCl₃ 1,5% y CPH-CHCl₃ 3,0%).

Estudios de Estabilidad

Los estudios de estabilidad a corto plazo tienen como propósito evaluar el comportamiento de alguna o algunas de las propiedades de una formulación ante una situación de stress por un período corto de tiempo. Algunas de esas propiedades que se pueden evaluar son la estabilidad química y física. De manera particular, los estudios de envejecimiento acelerado pueden predecir de manera aproximada la estabilidad de los componentes activos de una formulación, siempre que la temperatura sea el factor catalizador de la descomposición ^{11,12}. Hay varios modelos de evaluación acelerada de la estabilidad. Para este trabajo se eligió el modelo de estabilidad acelerada a un punto ¹³. Este modelo permite predecir si una preparación mantendrá su composición original dentro de un rango aceptado, luego de un tiempo establecido, a una temperatura de almacenamiento determinada; realizando un ensayo inicial (tiempo cero), y un único ensayo a los tres meses. En este estudio se quiso predecir si las lociones serían estables al cabo de dos años si fueran almacenadas a 25 °C, aceptando una pérdida de actividad del 10%. Los supuestos del modelo son que los procesos degradativos siguen una cinética de orden uno, y que la temperatura en el único catalizador de los mismos.

Para el desarrollo del estudio se prepararon independientemente tres lotes de laboratorio con cada fracción a las concentraciones descritas empleando una mezcla de acetona/isopropanol 75/25 como vehículo y envasadas en ampollas de vidrio tipo I previamente ensayados ¹⁴. Se empleó el mismo modelo biológico de edema auricular inducido por TPA como ensayo

funcional-analítico, considerando la actividad antiinflamatoria remanente como indicador de estabilidad, tomando la actividad a tiempo cero como el 100%. Los análisis se hicieron a tiempo cero y luego a los tres meses de envejecimiento acelerado a las temperaturas de 28 y 42 °C. Los resultados de presentan resumidos en la Tabla 5.

Los tres lotes de cada formulación, tanto a tiempo cero como a los tres meses y a cada temperatura, se compararon entre sí para determinar si existían diferencias significativas entre ellos. En ninguno se encontró diferencias, de tal manera que los datos de los tres lotes en cada condición se pudieron reunir y manejar como un solo gran lote con todos los datos de los tres. La Tabla 6 presenta los porcentajes de pérdida de actividad al cabo de esos tres meses para cada temperatura de envejecimiento, considerando los valores a tiempo cero como el 100%.

El modelo de estabilidad a un solo punto se basa en el hecho de que la mayoría de los fármacos, aunque pueden tener varias rutas degradativas, cada una de ellas suele seguir una cinética de orden uno y poseer energías de activación (E_a) con valores de 10 Kcal/mol o 25 Kcal/mol¹³, por lo que empleando la ecuación combinada de Arrhenius (Ecuación [2]), se puede construir una tabla predictiva de degradación acelerada (pérdida de concentración/actividad del componente activo de una formulación por

envejecimiento forzado catalizado por calor) a diferentes temperaturas, incluyendo desde luego, las empleadas durante el estudio (Tabla 7). Para construir dicha tabla, también se emplean las ecuaciones presentadas abajo.

$$k_2 = k_1 e^{\frac{E_a}{R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 \times T_1} \right)} \quad [2]$$

La Ecuación [3] calcula el t_{90} para un proceso cinético de primer orden, y la Ecuación [4] la concentración remanente (C) en función del tiempo a una temperatura dada para el mismo orden cinético. C_0 corresponde a la concentración/actividad inicial. Tomando C_0 como el 100%, el porcentaje degradado se calcula como $100 - C$.

$$t_{90} = \frac{0,1054}{k} \quad [3]$$

$$C = C_0 e^{-kt} \quad [4]$$

Los porcentajes de pérdida de actividad para la formulación de CPF-CHCl₃ a los tres meses de envejecimiento, fueron de $-0,89\% \pm 1,12$ y $0,30 \pm 2,09$ para 28 y 42 °C respectivamente. Para CPH-CHCl₃ las pérdidas son $0,22 \pm 1,72$ y $-0,32 \pm 1,25$ en el mismo orden. La Tabla 7 regis-

	Blanco		Indometacina		CPF-CHCl ₃		CPH-CHCl ₃	
	Edema (mg) ± ESM	Edema (mg) ± ESM	Inhibición %	Edema (mg) ± ESM	Inhibición %	Edema (mg) ± ESM	Inhibición %	
Tiempo 0	14,46 ± 0,77	1,93** ± 0,94	86,93	2,47** ± 0,65	82,24	4,17** ± 0,76	71,11	
3 meses 28°	15,88 ± 0,71	6,02** ± 1,18	78,25	2,37** ± 0,47	84,06	4,12** ± 0,74	71,13	
3 meses 40°	13,90 ± 0,57	6,85** ± 1,98	82,55	3,11** ± 0,87	78,33	3,05** ± 0,45	77,95	

Tabla 5. Edema y porcentaje de Actividad antiinflamatoria de las formulaciones de CPF-CHCl₃ y CPH-CHCl₃ durante los estudios de estabilidad. Los valores de CPF-CHCl₃ y CPH-CHCl₃ corresponden al promedio de los resultados de tres lotes. ** $p < 0,01$ comparado con el control (ANOVA seguido de test de Dunnett). Cada valor representa la media ± error estándar de la media de treinta animales para las fracciones y diez para blanco y control.

Formulación	Tiempo Cero	3 Meses 28°C	3 Meses 42°C	3 Meses 28°C	3 Meses 42°C
	% Inhibición ± ESM	% Inhibición ± ESM	% Inhibición ± ESM	% de Actividad Perdida ± ESM	% de Actividad Perdida ± ESM
CPF-CHCl ₃ 1,6%	100,00 ± 1,51**	100,89 ± 1,12**	99,70 ± 2,09**	-0,89 ± 1,12**	0,30 ± 2,09**
CPH-CHCl ₃ 3,2%	100,00 ± 1,70**	99,78 ± 1,72**	100,32 ± 1,25**	0,22 ± 1,72**	-0,32 ± 1,25**

Tabla 6. % Actividad antiinflamatoria de las formulaciones de CPF-CHCl₃ y CPH-CHCl₃ durante los estudios de estabilidad considerando la actividad a tiempo cero como el 100%, y pérdida de la misma al cabo de tres meses de envejecimiento acelerado a 28 y 42 °C. ** $p < 0,01$ comparado con el control (ANOVA seguido de test de Dunnett). Cada valor representa la media ± error estándar de la media de treinta animales.

Temp. °C	Ea: 10 Kcal/mol		Ea: 25 Kcal/mol	
	k (mes ⁻¹)	% Degrad	k (mes ⁻¹)	% Degrad
25	0,00439	1,31	0,00439	1,31
28	0,00520	1,55	0,00670	1,99
35	0,00761	2,26	0,01738	5,08
42	0,00989	2,92	0,03346	9,55
45	0,01275	3,75	0,06309	17,24

Tabla 7. Porcentajes de degradación y valores de k calculados siguiendo cinéticas de orden 1 y energías de activación de 10 y 25 Kcal/mol a varias temperaturas al cabo de tres meses.

tra los valores teóricos máximos de degradación que se pueden permitir luego de tres meses de envejecimiento acelerado a diferentes temperaturas, para garantizar que la preparación evaluada es estable en las condiciones de almacenamiento que se proponen, es decir, 2 años a 25 °C (envejecimiento natural). Los valores experimentales de degradación/pérdida de actividad deben ser inferiores a los calculados. Por ejemplo, para CPF-CHCl₃ a 28 °C y Ea de 10 Kcal/mol, el valor del porcentaje de degradación + ESM corresponde a 0,23, valor inferior al calculado: 1,55.

La Figura 1 es la representación gráfica de lo registrado en las Tablas 6 y 7. Para linearizar, se grafica el logaritmo de las degradaciones calculadas (teóricas) contra el recíproco de la temperatura. La línea azul corresponde a la degradación calculada asumiendo una Ea de 10Kcal/mol y la roja una de 25 Kcal/mol. Las líneas verticales verdes representan la media de la degradación alcanzada por la formulación CPH-CHCl₃ ± ESM, en tanto que las anaranjadas a la de la formulación CPF-CHCl₃ ± ESM, a las temperaturas de 28 y 42°C luego de tres meses de envejeci-

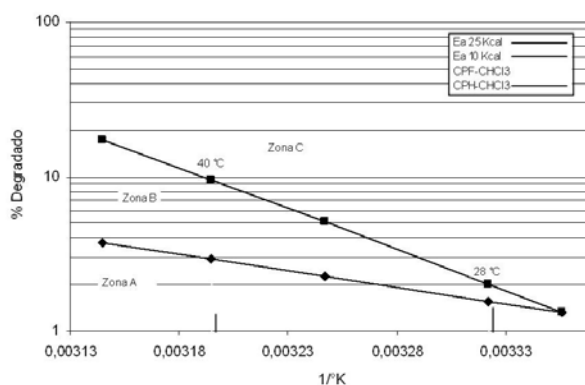


Figura 1. Logaritmo del porcentaje de degradación medio ± ESM (pérdida de actividad) de las formulaciones CPF-CHCl₃ y CPH-CHCl₃ contra el recíproco de la temperatura absoluta a tres meses de envejecimiento acelerado.

miento. Todos los valores experimentales son inferiores a los tabulados, por lo que en la Fig. 1 ninguna de las líneas verticales interseca a las diagonales, es decir, permanecen dentro de la Zona A, esto es, se puede garantizar la estabilidad sin restricción de los preparados por un período de dos años si se almacenan a una temperatura no mayor de 25 °C. La Zona B es una zona de seguridad. Si alguna de las formulaciones hubiera entrado en ella, aún se podría decir que el preparado es estable, pero de manera conservadora, esto es porque cualquier reacción de degradación que tenga una Ea inferior a 10 Kcal/mol, ocurre de manera espontánea, por lo que se recomendaría almacenar el producto a una temperatura inferior, aunque no necesariamente refrigerada. La Zona C es de exclusión, es decir, el producto no garantizaría estabilidad a 25°C por dos años, deberá ser un tiempo menor y requeriría almacenamiento refrigerado; o una revisión a fondo de la formulación.

DISCUSIÓN

Los estudios de preformulación o de diseño de un fitomedicamento involucran la evaluación de componentes que probablemente harán parte de la formulación, y de los que se necesita información para medir su impacto favorable o desfavorable en la misma. Los elementos que se evaluaron en este estudio fueron la concentración y la composición del probable vehículo. Originalmente se pretendía el diseño de un gel, debido a la facilidad que ofrece esta forma farmacéutica para su aplicación. Sorpresivamente se encontró que el empleo del polímero HPMC aparentemente captura los compuestos activos, disminuyendo drásticamente la biodisponibilidad de los mismos y desapareciendo por completo la actividad del preparado. Al probar con una arcilla coloidal como agente viscosante con la necesaria incorporación de una elevada proporción de agua y auxiliares de formulación procurando un emulgel, los resultados también fueron negativos. Esto motivó el cambio de forma farmacéutica a la de loción con base en solventes orgánicos. No se evaluaron otros viscosantes porque los resultados obtenidos con HPMC fueron muy concluyentes (pérdida de actividad del 100%), lo cual muy seguramente sucedería con otros derivados de celulosa, como la Carboxi-metil-celulosa sódica, por lo que no se justificaba desde el punto de vista ético el sacrificio innecesario de animales de laboratorio.

Como en el modelo de edema auricular los extractos o fracciones a evaluar se disuelven en

acetona, y los resultados fueron óptimos, la presencia de este vehículo en la formulación era adecuada, pero su empleo como vehículo único no es común en tecnología farmacéutica. Generalmente se utiliza en mezclas con alcohol isopropílico. El isopropanol sí se emplea como vehículo único y simplifica la formulación, ya que en proporciones mayores al 12%, posee suficiente capacidad antiséptica como para no requerir preservativos adicionales. Desafortunadamente, empleado como vehículo único, la eficacia de las preparaciones evaluadas se reduce en cerca de un 30%.

El 75% es un contenido alto de acetona, un vehículo que no es inerte debido al par de electrones libres de su grupo carbonilo (bases de Lewis), y a que pueden producir reacciones de sustitución nucleofílica (solvolisis)¹⁵, por esta razón se consideró necesario evaluar su impacto en la formulación con un estudio de envejecimiento acelerado, en el que se demostró que su uso no afecta la estabilidad/actividad de los compuestos activos.

Los modelos biológicos *in vivo*, como el empleado en este trabajo, necesariamente involucran un error experimental alto, lo que se refleja en el relativamente amplio rango de dispersión de datos de los resultados. Es por esto que en los estudios de estabilidad, a los tres meses de envejecimiento acelerado, se encontraron pérdidas de actividad negativas (Tabla 6), lo que significaría que los preparados son más activos a los tres meses que a tiempo 0. Esto podría suceder en el caso que probables productos de degradación tuvieran una actividad intrínseca superior a la de los compuestos originales. Para descartar esto, se compararon los resultados a tiempo cero y a los tres meses mediante un análisis de ANOVA seguido de test de Tukey, encontrando que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes ensayos, lo que quiere decir que no hubo ni pérdida ni ganancia de actividad durante el envejecimiento, esto es, el producto es estable. No obstante, en los estudios de estabilidad a un solo punto se suelen comparar las medias de las pérdidas \pm límites de confianza (LC). En la medida que se tengan menos datos (menos animales), estos límites se amplían. Una forma de reducir el error experimental, es incrementar el número de datos, pero en nuestro caso esto implica un costo ético en animales de experimentación, por lo que se optó por emplear el error estándar de la media (ESM) en lugar de los LC, ya que tiene un rango menor. Esto obliga a ser más conservadores al interpretar los resultados, lo cual será par-

ticularmente válido cuando se empleen modelos biológicos en estudios de estabilidad para asignar tiempos de vida útil (fecha de vencimiento) a productos que se van a comercializar.

CONCLUSIONES

Empleando el modelo de inhibición de la inflamación inducida por TPA, se logró obtener información relevante en cuanto a una posible formulación para una loción tópica con base en fracciones activas de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima*. Los modelos biológicos como indicadores de actividad y estabilidad durante los estudios de preformulación de fitopreparados, son válidos y útiles en tanto que se puedan desarrollar métodos instrumentales más económicos, confiables y rápidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- López, A. & C. Sánchez de Lorenzo (2001) "*Árboles en España. Manual de Identificación*", Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pág. 652
- Kumar, A., P. Muthusamy & V. Nirmala (2003) *Nat. Prod. Sci.* **9**: 256-9.
- Rao, Y.K., S. Fang, Y. Tzeng (2005) *J. Ethnopharmacol.* **100**: 249-53.
- Padma, P.R., S. Sumathi & S. Aparna (2001) *J. Med. Arom. Plant Sci.* **22/4A-23/1A**: 78-83.
- Young, J.M., B.M. Wagner & D.A. Spires (1983) *J. Invest. Dermatol.* **80**: 48-52
- Lapa, J., T. Monteiro De Lima (2001) "*Métodos Farmacológicos para la Validación de Plantas Medicinales*" CYTED, Pág. 61
- Kuehl, R.O. (2001) *Diseño de Experimentos*, Ed. Thomson Learning, México D.F., págs. 73-120
- Martindale, The Extra Pharmacopeia (1996), 31 Ed, Reynolds, J., Ed. Royal Pharmaceutical Society, Londres, pág. 1397
- Handbook of Pharmaceutical Excipients (1986) American Pharmaceutical Association, Washington, The Pharmaceutical Society of Great Britain, Londres, págs. 146.
- Finnin, B.C. & T.M. Morgan (1999) *J. Pharm. Sci.* **88**: 955-8.
- Pope, D.G. (1980) *Drug. Cosmet. Ind.* Noviembre: 54-62, 116.
- Pope, D.G. (1980) *Drug. Cosmet. Ind.* Diciembre: 48-66, 110-116.
- Ponce d'León, L.F., L. Herrera, M. Ferrer, Z. Fernández & A. Medina (1994) "*Guía para el Desarrollo y Presentación de los Estudios de Estabilidad de Medicamentos*" Ministerio de Salud, Colombia, 1994, Págs. 30-38
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (2006) 29 Ed. en Español. Prueba Física de Envases 611. pág. 2891
- March, J. (1992) "*Advanced Organic Chemistry*" Ed. Wiley Interscience, New York, Pág. 293-500