



## Comprimidos Comerciales con Extracto de Alcachofa en el Mercado Farmacéutico Argentino: Comparación de los Perfiles de Disolución y Valoración de Cinarina y Ácido Clorogénico por HPLC

Ma Rosario ALONSO <sup>1\*</sup>; Ma Andrea SPAGNUOLO <sup>1</sup>, Modesto RUBIO <sup>2</sup> y Graciela FERRARO <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Farmacognosia. IQUIMEFA,

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA),

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956 -1113 - Buenos Aires. Argentina

**RESUMEN.** En los últimos años hay un notable aumento de la demanda de fármacos con extractos vegetales estandarizados. Muchos de ellos, con indicación de actividad colagoga y colerética, contienen extracto de alcachofa. Con el objetivo de estudiar el comportamiento *in vitro* de preparaciones farmacéuticas con extracto de alcachofa presentes en el mercado argentino, se utilizaron tres formulaciones, se valoró su contenido en ácido clorogénico y cinarina por HPLC/UV y se determinó el perfil de disolución en cuatro medios diferentes. Los resultados demuestran que las tres formulaciones presentan contenidos y perfiles diferentes.

**SUMMARY.** "Pharmaceuticals Tablets with Artichoke Extracts in the Argentinean Market: Comparison of Dissolution Profiles and of Chlorogenic Acid and Cynarin Content by HPLC". The production of pharmaceuticals containing medicinal herb drugs and extracts has greatly increased in recent years. Of these products, many of those that are used as colagogues and cholericics contain artichoke extracts. In order to study the *in vitro* behavior of pharmaceutical preparations containing these extracts, three brand of tablets sold in Argentina were studied. The dissolution profile of cynarin and chlorogenic acid was determined in four different media. Samples were analysed by HPLC/UV. Results obtained for the three samples were diverse, showing differences up between formulations in chlorogenic acid and cynarin contents and dissolution profiles.

### INTRODUCCIÓN

La alcachofa (*Cynara scolymus* L., Asteraceae) es originaria de la región mediterránea de Europa, donde es ampliamente cultivada. Su flor se utiliza mundialmente con fines alimenticios y las hojas se usan con fines medicinales en preparaciones fitoterápicas con especial indicación en afecciones hepáticas. Existen medicamentos fitoterápicos que utilizan sus hojas en forma de infusión o de extractos hidroalcohólicos con indicaciones terapéuticas de colerético, colagogo y diurético.

Las hojas de alcachofa se caracterizan por su elevado contenido en flavonoides y ácidos fenilpropiónicos (alrededor de 1%) a los cuales se atribuyen varias de esas propiedades farmacológicas <sup>1</sup>. Existen reportes que indican que los extractos de las hojas producen desintoxicación del hígado y actividad colagoga y colerética <sup>2</sup>.

Ensayos en cultivos de hepatocitos de ratas indicaron que los extractos de alcachofa inhiben la síntesis de colesterol <sup>3</sup>, y aunque ensayos clínicos han puesto en evidencia que el efecto antihiperlipidémico de los extractos de alcachofa no es significativo, se determinó una leve disminución del colesterol total y de los niveles de colesterol-LDL, y se observó que mejora la función endotelial en casos de hiperlipemia <sup>4</sup>.

Las actividades biológicas de la alcachofa, principalmente su marcado efecto antioxidante, son atribuidos a su alto contenido en derivados del ácido cafeico, especialmente mono y dicafeoilésteres (ácido clorogénico y cinarina), hecho demostrado en experimentos *in vitro* en homogenatos de hígado de ratón <sup>5</sup>. Estudios recientes de biodisponibilidad *in vivo* han demostrado que los cafeoilésteres se absorben, metabolizan y excretan como derivados metilados y/o hidro-

**PALABRAS CLAVE:** Comprimidos, Extracto de alcachofa, HPLC.

**KEY WORDS:** Tablets, Artichoke extracts, HPLC.

\*Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mralonso@ffyb.uba.ar

genados, en la mayoría de los casos como conjugados de ácido glucurónico y sulfúrico <sup>6</sup>.

El porcentaje de ácidos fenólicos en este extracto vegetal varía considerablemente con el tipo de cultivo, el tratamiento post-cosecha de las hojas y el proceso extractivo utilizado, de modo que puede ocurrir que el contenido en cinarina sea muy bajo o directamente que no sea detectable. Las Farmacopeas internacionales de mayor consulta (USP, BP y EP) no presentan hasta el momento registro de métodos para realizar el control de calidad cuali y cuantitativo del extracto de alcachofa y /o de sus diferentes formas farmacéuticas.

El objeto del presente trabajo es evaluar comparativamente 3 formulaciones sólidas presentes en el mercado farmacéutico argentino: A, B y C, en cuatro medios de disolución con características químicas diferentes: agua, pH ácido, pH neutro y en presencia de un agente tensioactivo. La cuantificación de las muestras obtenidas se realizó por HPLC usando un gradiente en fase reversa, con detección UV. El test de disolución permitió evaluar la velocidad de disolución de los principios activos, en este caso valorados como cinarina y ácido clorogénico, presentes en el extracto de alcachofa utilizado en cada comprimido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materiales*

Se utilizaron formulaciones comerciales identificadas como A, B y C. Las muestras se adquirieron en Farmacias oficinales en diciembre de 2004 y fueron analizadas en su periodo de vida útil. Los nombres de los Laboratorios y los números de lotes de los comprimidos utilizados están archivados en IQUIMEFA-Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. El comprimido A tiene declarado 100 mg de extracto de alcachofa, mientras los comprimidos B y C 200 mg del mismo extracto.

### *Solventes, reactivos y testigos*

Metanol HPLC (Mallinckrodt), ácido acético p.a., ácido clorhídrico p.a., fosfato trisódico p.a. y laurilsulfato de sodio p.a. (Merck, Argentina). Se utilizó agua calidad ultrapura (Mili Q). El ácido clorogénico fue adquirido a Sigma (USA) y la cinarina fue provista por el Dr. S. Cañigüeral (Universidad de Catalunya, Barcelona, España).

### *Métodos*

El método analítico se realizó en un cromatógrafo Shimadzu, con dos bombas LC-9A, con

detector UV-Vis SPD-6AV a 316 nm. Se utilizó una columna fase reversa Phenomenex luna (ODS-250 mm x 4.6 mm diámetro interno x 5 µ diámetro de partícula) a temperatura ambiente (18 a 25 °C) realizando un gradiente de 20 min de duración en el cual la fase móvil B aumenta en forma lineal su composición de 15% a 40%; una vez finalizado el gradiente se deja 15 min en las condiciones iniciales para reequilibrar la columna. La fase móvil A está compuesta por agua-ácido acético (97,5: 2,5) y la fase móvil B es metanol-ácido acético (97,5 : 2,5), el flujo fue de 1,3 ml/ min. El tiempo de retención para el ácido clorogénico fue de 10 min y el de la cinarina 14 min. Los datos fueron procesados con un integrador C-R6A, utilizando el método del estándar externo.

El equipo de disolución fue fabricado y donado a la Cátedra de Farmacognosia por Laboratorios Pablo Cassará SRL. El equipo cuenta con la calibración mecánica al día y fue validado con las pastillas de ácido salicílico x 300 mg y prednisona x 10 mg según recomendaciones de USP28 <sup>7</sup>. Se utilizaron paletas (Aparato 2) USP28 <sup>7</sup>. El ensayo se realizó usando un volumen de 500 ml de cada medio ensayado.

### *Análisis de Datos*

Los datos obtenidos se analizaron según recomendación ANMAT en su disposición N° 3185/99 <sup>8</sup> que coincide con la "Guidance for Industry" (US department; 1997) desarrollado por la FDA <sup>9</sup> y EMEA 1999 <sup>10</sup>. Se calcula el f2 como factor de similitud entre diferentes formulaciones y el f1 como factor de diferencia.

## RESULTADOS

### *Validación parcial del método utilizado*

Se probaron los parámetros de linealidad, selectividad y precisión intraensayo en las concentraciones de trabajo y se determinó el límite de detección y de cuantificación para cada uno de los componentes estudiados.

En el caso de la linealidad se realizó una curva con ácido clorogénico y cinarina; se hicieron 7 puntos con 3 a 5 repeticiones de cada uno. Se construyó una curva de cinarina de 0,0125 µg / ml a 12,5 µg / ml. La ecuación de la recta obtenida fue de:  $Y = 850.1X - 54.915$ , con un  $R^2$  (coeficiente de correlación) = 0,9969. Se hizo lo propio con ácido clorogénico (de 0,0103 µg / ml a 10,3 µg / ml. La ecuación de la recta obtenida fue de:  $Y = 582.47 X - 27.033$ , con un  $R^2$  (coeficiente de correlación) = 0,9976.

La selectividad fue demostrada en cada caso comprobando que no hubieran interferencias con picos presentes en los medios de disolución elegidos. Para cada medio ensayado se utilizaron muestras blanco.

Para la precisión intraensayo: se realizó el coeficiente de variación porcentual en dos concentraciones diferentes. En el caso de cinarina se obtuvo 4,08% para 0,0125 µg/ml y 1,54% para 12,5 µg/ml. Con el ácido clorogénico los valores fueron 6,49% para 0,0103 µg/ml y 2,92% para 10,3 µg/ml.

El límite de cuantificación para la cinarina fue de 125 µg/ml y para el ácido clorogénico: de 0,0103 µg/ml. El límite de detección en ambos casos fue de 0,005 µg / ml.

**Análisis de las formulaciones**

En la Tabla 1 podemos observar la composición de los comprimidos: su contenido en extracto de alcachofa, ácido clorogénico y cinarina. Los valores declarados de extracto de alcachofa difieren (comprimido A tiene 100 mg y B y C 200 mg). Las diferencias en contenido no hacen posible determinar la equivalencia farmacéutica debido a que es un requisito la igualdad del mismo. También observamos diferencias en cuanto a la valoración de ácido clorogénico (C contiene mayor cantidad que B) y en los conte-

nidos de cinarina entre las tres formulaciones (A contiene trazas, y C tiene mayor contenido que B). Otra diferencia que surge del análisis de la tabla es que la proporción entre ambos marcadores es diferente en las tres formulaciones. Estas diferencias en el contenido de ácido clorogénico y cinarina se deben a la época del año en que fue recolectada la planta y al tratamiento post cosecha que recibieron las hojas.

**Ensayo de disolución**

Se realizó en cuatro medios con diferencias en el pH, fuerza iónica y en uno de los medios en presencia de un agente tensioactivo. La composición de los mismos fue: agua, ácido clorhídrico 0,1 N, fosfato trisódico 0,05M (pH 6,8), y laurilsulfato de sodio al 1% en agua. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 1 a 4.

Como se puede observar en las Figs. 1 a 4, el estudio de las formulaciones A, B y C muestra un perfil de disolución diferente. El comprimido A se disgrega y disuelven sus principios activos con una velocidad significativamente mayor que en los otros dos casos. De las tres formulaciones, B y C no llegan a disolver el 100% al final del ensayo en los medios probados y como se detalla en la Tabla 2 a los 30 min sólo es posible detectar trazas de ambos marcadores en la mayoría de los casos.

Formulación	Contenido declarado: Extracto de alcachofa (mg/ comprimido)	Ac. Clorogénico (mg/ comprimido)	Cinarina (mg/ comprimido)
A	100	0,86 ± 0,01	Trazas
B	200	1,08 ± 0,02	1,10 ± 0,05
C	200	1,42 ± 0,07	1,72 ± 0,09

Tabla 1. Composición de los comprimidos utilizados.

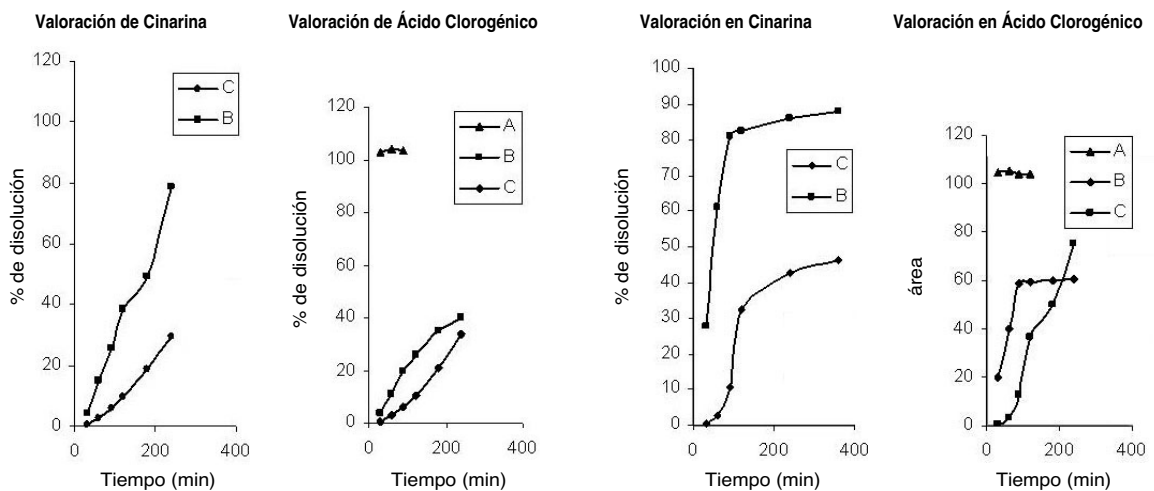


Figura 1. Disolución en agua.

Figura 2. Disolución en buffer fosfato.

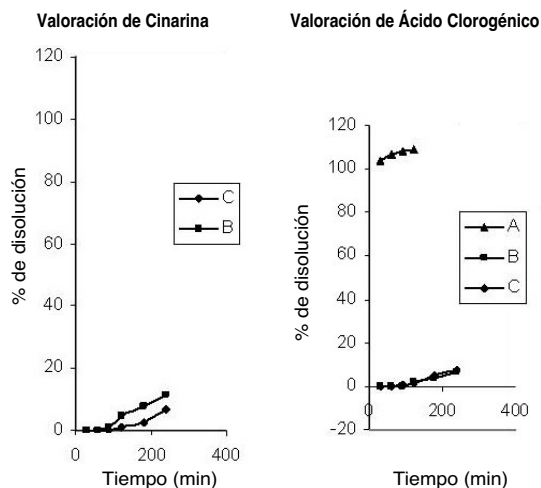


Figura 3. Disolución en ácido clorhídrico 1 N.

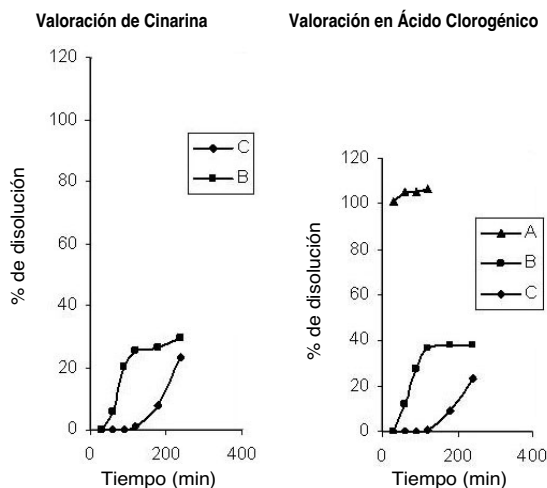


Figura 4. Disolución en laurilsulfato de sodio 1% en agua.

30 minutos % en disolución		
Formulaciones en Agua	Ácido Clorogénico	Cinarina
A	102,9 ± 5,1	no detectable
B	5,8 ± 6,6	4,5 ± 5,3
C	0,7 ± 1,2	0,6 ± 1,0
Formulaciones en buffer fosfato pH: 6,8		
A	104,4 ± 4,7	no detectable
B	29,1 ± 3,5	27,9 ± 3,5
C	No detectable	0,6 ± 0,7
Formulaciones en HCL		
A	103,6 ± 3,8	no detectable
B	no detectable	no detectable
C	no detectable	no detectable
Formulaciones LLS 1% en agua		
A	101,0 ± 8,1	no detectable
B	no detectable	no detectable
C	no detectable	no detectable

Tabla 2. Porcentaje de ácido clorogénico y cinarina obtenido en cada medio ensayado a los 30 min.

**DISCUSIÓN**

La política actual de medicamentos del Ministerio de Salud de la República Argentina determina que la prescripción debe ser por nombre genérico. Este hecho llevó a analizar la ofer-

ta del mercado, estudiando el comportamiento de diferentes especialidades medicinales con un mismo extracto declarado. El propósito de estos análisis es garantizar un mercado farmacéutico que pueda ser objeto de intercambiabilidad. Estudios semejantes se realizaron en diferentes países para numerosas drogas como por ejemplo para Rifampicina <sup>11</sup> y a nivel local para carbamazepina <sup>12</sup>. En este caso en particular se eligió trabajar con productos que contienen extracto de alcachofa, debido a que son medicamentos con alto índice de consumo en nuestra población. La comparación de los perfiles obtenidos en medios diferentes es útil para comparar distintas marcas del mercado que tienen el mismo principio activo <sup>8-10</sup> y a su vez, el ensayo se puede implementar como rutina en el Laboratorio de control de calidad para comprobar que la curva de disolución del comprimido no varía entre lotes si no se realizan cambios en su formulación. B y C podrían considerarse equivalentes farmacéuticos por el contenido declarado de extracto de alcachofa, sin embargo tanto el análisis de ácido clorogénico y cinarina como los perfiles de disolución obtenidos indican que no lo son. Esto muestra la importancia de declarar el porcentaje de bioactivos presentes en los extractos utilizados para la elaboración de medicamentos fitoterápicos.

Observando el comportamiento de las tres formulaciones, no es posible realizar el análisis que recomiendan ANMAT en su disposición 3185/99 <sup>8</sup> y también FDA <sup>9</sup> y EMEA <sup>10</sup>, debido a que B y C no cumplen con los requisitos para el cálculo del factor f2 como parámetro de similitud y el f1 de diferencia.

**Agradecimientos.** Agradecemos al Dr. S. Cañigüeral (Universitat de Catalunya, España) por proveernos el testigo de Cinarina. A la Farm. Erica Wilson, Bioquímica Claudia García Bonelli, Farm. Paula López y Farm. Bárbara Grandi por su desinteresada colaboración.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mulinacci, N., D. Prucher, M. Peruzzi, A. Romani, P. Pinelli, C. Giaccherini & F. Vincieri (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**: 349-57.
2. Lietti, A. (1977) *Fitoterapia* **4**: 153-8.
3. Gebhardt, R. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**: 1122-8.
4. Lupattelli, G., S. Marchesi, R. Lombardini, A. Roscini, F. Trinca, F. Gemelli, G. Vaudo & E. Mannarino (2004) *Life Sci.* **76**: 775-82.
5. Fraga, C., V. Martino, G. Ferraro, J. Coussio & A. Boveris (1987) *Biochem. Pharmacol.* **36**: 717-20.
6. Wittemer, S.M., M. Ploch, T. Winddeck, S.C. Müller, B. Drewelow, H. Derendorf & M. Veit (2005) *Phytomedicine* **12**: 28-38.
7. USP 28 (2005) "Dissolution". United States Pharmacopoeia, Rockville, Maryland, USA, pág. 2413.
8. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina (ANMAT, 1999) Disposición 3185
9. U.S. Department of Health and Human Services / FDA-CDER (1997) *Guidance for industry. Dissolution of immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. Document Rockville, MD 20 857, BP1, Office of Training and Communications (www.fda.gov/cder/guidance. Htm) pp 1- 12. (Consulta sept. 2006).
10. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (1999) *Note for guidance Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drugs products: chemical substances, on quality of modified release products. A: oral dosage forms; Transdermal dosage forms, section I (quality)*, pp 1-15.
11. Agrawal, S. & R. Panchagnula (2004) *Int. J. Pharm.* **287**: 97-112.
12. Volonté, M.G., M.A. Viñas, P.M. de Buschiazzo, M.V. Piersante, M.C. Escalas & C.E. Gorriti (2004) *Acta Farm. Bonaerense* **23**:391-7