

República de Cuba

**Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales
Departamento de Farmacia**

Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de una nueva formulación de tabletas, obtenida a partir del extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.

**Tesis en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Jesús Rafael Rodríguez Amado

**Santiago de Cuba
2012**

República de Cuba

**Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales
Departamento de Farmacia**

**Tesis presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de una
nueva formulación de tabletas obtenida a partir del extracto
blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.**

Autor: Lic. Jesús Rafael Rodríguez Amado

**Tutores: Dr. C. Gustavo Sierra González
Dr. C. Antonio Iraizoz Colarte
Dr. C. Humberto Morris Quevedo**

**Santiago de Cuba
2012**

DEDICATORIA

A mi madre, esta hubiera sido su gran alegría.

A mi padre y hermanos, por su preocupación constante y permitirme la lejanía...

A mis hijos, mis ángeles guardianes, todo siempre para ustedes, todo...

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de departamento... A TODOS...gracias por permitirme recorrer este camino a su lado, éste es también su resultado...

A Ariadna y Jhonnito, por estar a mi lado dándome fuerzas, mientras pasaba la tarde y la mitad de la noche ante sus ojos, y yo sentado en la computadora...

A la Dra Magalis Casals por su confianza, su fe y su voluntad de hacer el bien...

A Dra América García, por haberme dado siempre un consejo preciso y un aliento...

A Fidel Guerrero, por su ayuda incondicional y por su tiempo.

A Hady Keyta, por su ayuda y su confianza. Sin él este trabajo no hubiera sido posible.

A Renato, por su ayuda inmediata e incondicional, a lo largo de todos estos años...

A Julio César, por permitirme consumir su tiempo y por su ayuda en el momento preciso...

Al profesor Gustavo Sierra, por ser ejemplo de la voluntad de hacer, y hacerlo bien en nuestra sociedad...

Al Profesor Tony Iraizoz, por su tiempo, esfuerzo e incondicionalidad...

A la Profesora Clara Martínez, por ofrecerme su tiempo y su sapiencia...

A Humberto Argota, por su ayuda incondicional...

A Edgar, Yoandra, Dani, Elizabeth, Dagmara, Arianna, Onel, Lidia, Alexander y demás compañeros de TOXIMED por su vital colaboración, para llegar a estos resultados...

A la dirección de la Facultad de Ciencias Naturales, en especial a Rosa María...

A Viviana García Mir, por toda su ayuda...

A todos los estudiantes que realizaron sus tesis en este tema en nuestro grupo de investigación...

A los profesores del CeeS “Manuel F. Gram”, por enseñarme a ver, que la verdad estaba afuera...

A todos, mi más sincero agradecimiento...

CONTROL SEMÁNTICO

Droga: Todo producto de origen natural que recolectado o separado de su medio tiene una composición y unas propiedades tales que dentro de su complejidad constituye la forma bruta de un medicamento.

Decocción: Procedimiento extractivo en el cual la droga es extraída por ebullición en agua por al menos 15-20 minutos. El resultado de este proceso extractivo es también conocido popularmente como cocimiento.

Percolación: Procedimiento extractivo que consiste en el paso del menstruo en repetidas ocasiones a través de la droga cruda, previamente humectada, que se encuentra en el percolador.

Extracto Fluido: Formulación farmacéutica obtenida mediante la remoción de los componentes activos de las drogas respectivas con menstros apropiados, la evaporación de todo o casi todo el solvente y el ajuste de las masas o polvos residuales para que cumplan las normas prescriptas, en la cual cada mililitro de extracto equivale a 1.0 g de la droga.

Extracto blando: Formulación farmacéutica obtenida mediante la concentración o la evaporación de casi todo el solvente del extracto fluido y en la cual cada mililitro de extracto equivale a 2 - 4 g de la droga.

Preformulación: Etapa inicial para el desarrollo de una formulación farmacéutica, en la que se estudia al principio activo, se seleccionan los excipientes que acompañarán al principio activo en la formulación, y a través de diversas pruebas se asegura que no ocurrirán problemas de estabilidad, como consecuencia de las interacciones entre los principios activos y los excipientes o entre los excipientes seleccionados.

Formulación: Etapa del desarrollo de una formulación farmacéutica donde se evalúa la influencia de los excipientes en las propiedades de la formulación, y permite seleccionar la fórmula en la que mejor se mantienen las propiedades de pureza y potencia del principio activo.

Estabilidad: Propiedad de cualquier forma farmacéutica para mantener las especificaciones señaladas y aceptadas en la monografía que aseguren sus características físicas, químicas, microbiológicas y biofarmacéuticas desde su preparación y durante todo el período de validez.

Estabilidad acelerada: Son estudios que se realizan sometiendo los principios activos o las formas farmacéuticas terminadas, a condiciones de estrés (luz, humedad, temperatura, agentes oxidantes redox, etc.) para evaluar su comportamiento en dichas condiciones.

Estabilidad en estante: Son los estudios que se realizan a las formas farmacéuticas, estando éstas sometidas a condiciones estándares de envasado y conservación, a lo largo del tiempo, para evaluar la estabilidad del principio activo y de la formulación en general y validar su período de vida útil.

Tableta o comprimido: Estructura obtenida por compresión de principios activos y sustancias auxiliares que son geométricamente simétricas en su aspecto radial.

Granulado: Agregado que se produce por diferentes vías con la finalidad de mejorar la fluidez y la facilidad con que comprimen masas de polvos que se van a utilizar en la fabricación de tabletas.

Gráfico de trazos: Gráfico que muestra el efecto del cambio en la respuesta para cada componente de la formulación a lo largo de una línea imaginaria del centro de la mezcla de referencia al vértice de la misma. Según la cantidad de un componente aumenta, la cantidad de los otros disminuye y viceversa, pero su relación permanece constante.

Matriz: Cavidad de la máquina de comprimir tabletas, donde se deposita el polvo o granulado en el momento que va a ser comprimido.

Punzones: Piezas de acero que penetran en la matriz llena de polvos o granulados que producen la compresión de los mismos.

Aglutinante: Sustancia que se añade a los polvos para facilitar la formación del gránulo en los procesos de granulación.

Desintegrante: Sustancia que se añade a la masa de polvos o granulados para que, una vez que la tableta llega al tracto digestivo sea capaz de romper la tableta para que se inicien los procesos de disolución del principio activo y pueda éste llegar al torrente sanguíneo.

Tiempo de desintegración: Tiempo efectivo en el que la tableta se desintegra totalmente.

Friabilidad: Propiedad de las tabletas o comprimidos de perder partes debido a la acción de las fuerzas mecánicas a las que se someten durante su preparación, envasado, transportación y uso por el paciente.

SÍNTESIS

El Tamarindo (*Tamarindus indica* L) es una planta medicinal poco estudiada en Cuba y en el mundo. El uso etnobotánico de esta planta como hepatoprotector, se refiere desde hace más de 50 años en Cuba. Las hojas han sido el órgano menos investigado y la decocción de éstas es consumida por la población cubana para el tratamiento de las hepatopatías. Sin embargo, en el Sistema de Salud se importan los fármacos para el tratamiento de estas enfermedades, ya que en el Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba no se contempla ningún fármaco hepatoprotector. En el presente trabajo se estandarizó el extracto blando de las hojas de *Tamarindus indica* L. como un nuevo Ingrediente Farmacéutico Activo, rico en metabolitos entre los que destacan: polifenoles, flavonoides, triterpenos, aceites esenciales, ácidos grasos, compuestos volátiles y elementos minerales, como el cobre, cinc, manganeso, níquel y selenio. Con este extracto se desarrolló una formulación de tabletas, a la cual se le evaluó su capacidad antioxidante y hepatoprotectora. En este proceso se obtuvieron modelos teóricos que permiten predecir las propiedades físico-mecánicas de los granulados y las propiedades tecnológicas de las tabletas. La estabilidad de las propiedades tecnológicas de las tabletas se mantuvo hasta 18 meses, la estabilidad microbiológica se mantuvo durante dos años y la estabilidad química se ha evaluado hasta 9 meses. Por ello, la estabilidad integral de la formulación de tabletas, envasadas en frasco de cloruro de polivinilo de alta densidad con tapa inviolable, y almacenadas en lugar seco y fresco, se informa hasta nueve meses. Esta forma farmacéutica no mostró toxicidad aguda oral en ratas Sprague Dawley a la dosis límite de 2000 mg/kg de peso y produce una irritabilidad media de la mucosa oral. Los dos niveles de dosis evaluados (100 y 200 mg/kg de peso) inhibieron la peroxidación lipídica y mostraron actividad antioxidante y hepatoprotectora frente al modelo de intoxicación hepática con tetracloruro de carbono. El efecto observado resultó similar estadísticamente al producido por la silimarina; fármaco utilizado como control en una dosis de 150 mg/kg de peso corporal. Los resultados de la tesis por vez primera aportan elementos que evidencian las propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras de una forma farmacéutica sólida obtenida a partir de las hojas de *Tamarindus indica* L.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis de la investigación	4
Objetivo General	4
Objetivos específicos	4
I. Revisión bibliográfica	7
I.1 Fisiopatología de las lesiones hepáticas	7
I.1.1 Hígado. Estructura-función	7
I.1.2 Lesiones hepáticas	7
I.1.3 Pruebas del funcionamiento hepático	8
I.2 Estrés oxidativo y defensa antioxidante	9
I.2.1 Estrés oxidativo hepático	11
I.2.2 La intoxicación con tetracloruro de carbono	12
I.3 Tratamiento de las enfermedades hepáticas	13
I.4 <i>Tamarindus indica</i> L: composición fitoquímica y evaluaciones fármaco toxicológicas	14
I.4.1 Generalidades	14
I.4.2 Composición fitoquímica	15
I.4.3 Actividad farmacológica de las hojas de <i>Tamarindus indica</i> L.	16
I.4.4 Estudios toxicológicos de hojas de <i>Tamarindus indica</i> L.	18
I.5 Las formas farmacéuticas con productos naturales	18
I.5.1 Etapa de preformulación	19
I.5.2 Diseños de experimento	20
I.5.3 Etapa de formulación	20
I.5.4 Estudios de estabilidad	21
I.6 Tabletas o comprimidos	22
I.6.1 Métodos de preparación de tabletas	22
I.6.2 Propiedades de los granulados	23
I.6.3 Propiedades de las tabletas	23
I.7 Evaluación toxicológica de fármacos	26
II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
II.1 Selección del material vegetal	28
II.2 Obtención y estandarización del extracto blando	28
II.2.1. Método de preparación	28
II.2.2 Determinación de la huella espectral UV	29
II.2.3 Evaluación de las propiedades físicas y fisicoquímicas	29
II.2.4 Determinación de polifenoles y flavonoides	29
II.2.5 Análisis de elementos minerales por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP)	29
II.2.6 Establecimiento de los indicadores de calidad del extracto blando	30
II.3 Desarrollo de la formulación de tabletas de tamarindo	31
II.3.1 Etapa de preformulación	31
II.3.1.1 Selección de los excipientes	31
II.3.1.2 Estudio de compatibilidad extracto blando-excipientes	31
II.3.1.3 Estudio de posibles interferencias de los excipientes en el método de determinación de polifenoles	32

INDICE continuación...

II.3.1.4 Evaluación del efecto de la temperatura. Análisis térmico	33
II.3.1.5 Cromatografía en capa delgada	34
II.3.1.6 Selección de la cantidad de principio activo a utilizar en la formulación	34
II.3.1.7 Evaluación preliminar de formulaciones de tabletas de tamarindo	35
II.3.2 Etapa de formulación y optimización de las tabletas	35
II.3.2.1 Diseño de experimento	35
II.3.2.2 Método de preparación de los granulados y tabletas	36
II.3.2.3 Evaluación de la calidad de los granulados	36
II.3.2.3.1 Evaluación del tamaño medio de partícula	36
II.3.2.3.2 Índices de Hausner y de compresibilidad	37
II.3.2.3.3 Determinación de la velocidad de flujo	37
II.3.2.3.4 Determinación del ángulo de reposo	38
II.3.2.3.5 Humedad residual	38
II.3.2.4 Evaluación de la calidad de las tabletas	38
II.3.2.4.1 Organolépticas	38
II.3.2.4.2 Uniformidad de masa	38
II.3.2.4.3 Altura de la tableta	38
II.3.2.4.4 Dureza	39
II.3.2.4.5 Friabilidad	39
II.3.2.4.6 Tiempo de desintegración	39
II.3.2.4.7 Uniformidad de contenido	39
II.3.3 Estudio de la estabilidad en estante	39
II.3.3.1 Estabilidad física y química	40
II.3.3.2 Estabilidad química por Cromatografía de Capa Delgada	40
II.3.3.3 Estabilidad microbiológica	40
II.4 Evaluación fármaco toxicológica de las tabletas de tamarindo	41
II.4.1 Biomodelos experimentales y consideraciones éticas	41
II.4.2 Estudio toxicológico de las tabletas de <i>Tamarindus indica</i> L	42
II.4.2.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral	42
II.4.2.2 Evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral	43
II.4.2.3 Análisis estadístico	44
II.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora	44
II.4.3.1 Diseño experimental	44
II.4.3.2 Preparación de las muestras de ensayo	45
II.4.3.3 Observaciones clínicas	46
II.4.3.4 Determinación del peso relativo del hígado	46
II.4.3.5 Actividad antioxidante	46
II.4.3.5.1 Determinación de malonildialdehído	46
II.4.3.5.2 Determinación de superóxido dismutasa	46
II.4.3.5.3 Determinación de catalasa	47
II.4.3.5.4 Determinación de glutatión reducido	47
II.4.3.6 Actividad hepatoprotectora	47
II.4.3.6.1 Determinación de aminotransferasas	47
II.4.3.6.2 Fosfatasa alcalina	48

INDICE continuación...

II.4.3.6.3 Gamma-glutariltranspeptidasa	48
II.4.3.6.4 Bilirrubina total y directa	49
II.4.3.6.5 Proteínas totales	49
II.4.3.6.6 Lípidos totales	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
III.1 Obtención y estandarización del extracto blando	50
III.1.1 Evaluación de las propiedades organolépticas	50
III.1.2 Evaluación de las propiedades físicas y fisicoquímicas	51
III.1.3 Contenido de polifenoles y flavonoides	51
III.1.4 Contenido de elementos minerales del extracto blando de <i>Tamarindus indica</i> L.	52
III.1.5 Huella espectral UV	53
III.2 Preformulación de las tabletas de <i>Tamarindus indica</i> L	53
III.2.1 Evaluación de interferencias de los excipientes en el método de determinación de polifenoles en las mezclas binarias	53
III.2.2 Evaluación de las mezclas binarias	54
III.2.2.1 Influencia de la temperatura en las mezclas binarias	55
III.2.3 Análisis térmico	56
III.2.4 Cromatografía de capa delgada	57
III.2.5 Propiedades físico mecánicas de los granulados preformulados	58
III.2.6 Propiedades tecnológicas de las tabletas preformuladas	59
III.3 Formulación de las tabletas de <i>Tamarindus indica</i> L	61
III.3.1 Evaluación de la calidad de los granulados	61
III.3.1.1 Índice de compresibilidad	61
III.3.1.2 Índice de Hausner	63
III.3.1.3 Velocidad de flujo	64
III.3.1.4 Ángulo de reposo	65
III.3.1.5 Humedad residual	66
III.3.1.6 Tamaño y distribución del tamaño de partícula	67
III.3.2 Evaluación de la calidad de las tabletas	67
III.3.2.1 Propiedades organolépticas	67
III.3.2.2 Dureza	67
III.3.2.3 Tiempo de desintegración	69
III.3.2.4 Friabilidad	71
III.3.3 Optimización y validación de los resultados	72
III.3.4 Estudios de estabilidad en estante	74
III.4 Evaluación toxicológica de las tabletas de <i>Tamarindus indica</i> L	76
III.4.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral	76
III.4.1.1 Signos clínicos	77
III.4.1.2 Comportamiento del peso corporal	77
III.4.1.3 Estudio anatomopatológico	77
III.4.2 Irritabilidad de la mucosa oral	78
III.4.2.1 Comportamiento del peso corporal	78
III.4.2.2 Evaluación histopatológica	79

INDICE continuación...

III.5	Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora	80
III.5.1	Observaciones clínicas	80
III.5.2	Peso relativo del hígado	80
III.5.3	Evaluación de la actividad antioxidante	81
III.5.3.1	Determinación de malonildialdehído	81
III.5.3.2	Superóxido dismutasa	82
III.5.3.3	Efecto en los niveles de catalasa	83
III.5.3.4	El glutatión reducido	84
III.5.3.5	Sinergia en la actividad antioxidante de las tabletas de tamarindo	85
III.5.4	Evaluación de la actividad hepatoprotectora	86
III.5.4.1	Transaminasas o aminotransferasas	86
III.5.4.2	Fosfatasa alcalina	88
III.5.4.3	Gamma-glutamyltranspeptidasa	89
III.5.4.4	Bilirrubina total y directa	90
III.5.4.5	Proteínas totales	91
III.5.4.6	Lípidos totales	92
III.5.4.7	Sinergia en la actividad hepatoprotectora de las tabletas de tamarindo	94
	Conclusiones	96
	Recomendaciones	97
	Referencias bibliográficas	
	Anexos	
	Bibliografía del autor	

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas representan en la actualidad la oncenava causa de muerte en Cuba (Vega, 2011), sin embargo, no existe en el Cuadro Básico de Medicamentos de nuestro país un fármaco específico para el tratamiento de dichas patologías. Internacionalmente, el medicamento más utilizado con estos fines es el Legalón[®] (cápsulas), consistente en una mezcla de los flavonoides silibina, silicristina y silidiamina. A esta mezcla de flavonoides se le atribuye un fuerte carácter hepatoprotector, mediado por un mecanismo de acción antioxidante. En Cuba es utilizada, sólo cuando se adquiere por donativos (Informe de Consumo de Medicamentos Santiago de Cuba, 2010).

Esta carencia unida a la práctica etnobotánica de nuestra población, ha conducido al empleo de un número variable de plantas y preparados caseros para el tratamiento de las dolencias hepáticas, sin que en ello medie la evidencia científica de su efectividad, e inocuidad. Adicionalmente, este uso empírico no permite la estandarización ni la dosificación correcta de los preparados consumidos.

La utilización de fitofármacos en la terapéutica mundial se encuentra en una etapa de evidente expansión. Tanto las sustancias puras como los principios activos aislados y purificados, o los extractos estandarizados de plantas medicinales, adquieren una importancia cada vez mayor, en virtud de una mejor caracterización analítica, lo que redundará favorablemente en el cumplimiento de los requisitos de calidad, eficacia y seguridad exigidos a cualquier medicamento (Farnsworth y Morris, 2005).

Los objetivos fundamentales de la investigación con plantas medicinales en la actualidad, están encaminados a la identificación de plantas con actividad farmacológica y al descubrimiento de nuevas entidades terapéuticas y de moléculas activas, que podrían convertirse en medicamentos por procesos de síntesis o por la validación de su uso etnofarmacológico (Sharapin, 2000). Esta selección de especies a investigar no se realiza al azar, sino por sólidos criterios, entre los que se encuentran los de tipo quimiotaxonómicos y etnofarmacológicos, siendo estos últimos los más empleados (Elizabetsky, 2004). Se afirma que para situar un medicamento de origen químico sintético en el mercado, es necesario evaluar 22 900 sustancias y que esta relación disminuye de 1 a 400, si en la investigación

farmacológica se toman como base los criterios etnofarmacológicos (Svensen y Scheffer, 1992).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce en varias resoluciones la importancia de las plantas medicinales y recomienda que: “*el aseguramiento de la calidad, la evaluación de la eficacia de las preparaciones, y las especificaciones de identidad, pureza y potencia; sean establecidos bajo sólidos criterios científicos y haciendo uso de las Buenas Prácticas de Fabricación*” (Akerelle, 2004). Propone además la OMS, el establecimiento de centros para la investigación y capacitación en el estudio de las plantas medicinales (Souza, 2003).

En Cuba a partir de 1992, se realizan esfuerzos que, además de cumplir con las pautas establecidas por la OMS, permiten al país minimizar la carencia de medicamentos genéricos, al ser estos sustituidos por formas farmacéuticas elaboradas a partir de plantas medicinales.

Cuba cuenta con una flora variada y abundante, en la que se encuentran numerosos *taxa* con propiedades medicinales, un ejemplo de este potencial lo constituye la especie *Tamarindus indica* L. o tamarindo, como se le conoce comúnmente. Esta especie ha sido reconocida etnobotánicamente como una de las principales alternativas para el tratamiento de desórdenes hepáticos, siendo una de las especies más empleadas por la población cubana con dichos fines (Roig, 1988).

Evidencias experimentales de nuestro grupo de trabajo han demostrado, a nivel preclínico, el efecto hepatoprotector de extractos de hojas de tamarindo (Escalona y col., 1995). Dicho efecto podría ser el resultado de la actividad antioxidante demostrada de varios de los compuestos químicos aislados de las hojas de esta especie, ya sea individualmente o formando parte de una mezcla de compuestos, como la que se obtiene al formular un extracto fluido en etanol al 70%. Esta última preparación, mostró una actividad antioxidante superior al de sus componentes aislados en la casi totalidad de los ensayos *in vitro* evaluados (Escalona, 2011^a).

Estos resultados podrían ofrecer una explicación científica al hecho de que los niveles de aminotransferasas, en los enfermos de hepatitis que consumen infusiones y decocciones de las hojas de tamarindo, disminuyan a niveles normales poco tiempo después de su uso. No obstante, ambas actividades farmacológicas

(hepatoprotectora y antioxidante) han sido evaluadas en experimentos y modelos experimentales diferentes, limitando así la información en cuanto a su correlación y dependencia. El extracto fluido de hojas de *Tamarindus indica* L, presenta como inconvenientes, un elevado contenido de etanol (incompatible con el funcionamiento hepático), una baja concentración de principios activos (incremento de la frecuencia de administración), estabilidad relativamente baja, elementos característicos de las formas farmacéuticas líquidas. Asimismo, se ha notificado la irritabilidad de la mucosa oral causada en animales de laboratorio por dicho extracto fluido, probablemente por el pH ácido del mismo (Informe de investigación, TOXIMED 2009^a)

Desde el punto de vista biofarmacéutico y tecnológico, en la búsqueda de soluciones a esta problemática, sería recomendable el diseño de formas farmacéuticas de contenido alcohólico muy bajo o nulo, por concentración del extracto fluido, para disminuir así la cantidad a consumir por el paciente y facilitar además su administración. Ello implica la preparación de una forma farmacéutica sólida como la alternativa tecnológica más estable a partir de productos naturales.

En este sentido, la preparación de extractos secos (Souza y Oliveira, 2006, Georgetti y col., 2008) y la microencapsulación (De Luca y Call, 2007; Mourtzinos y col., 2008) a partir de los extractos naturales vegetales, son procedimientos innovadores en la investigación en el área de la Tecnología Farmacéutica de los productos naturales. Estos procedimientos se utilizan para solucionar los inconvenientes de las formas farmacéuticas líquidas elaboradas con extractos líquidos y constituyen los métodos de elección primarios del tecnólogo farmacéutico para la preparación de formas farmacéuticas sólidas a partir de estos productos.

Otra vía para solucionar aquellos problemas, es la preparación de polvos y granulados a partir del extracto blando de las especies, absorbiéndolos en excipientes tecnológicos y preparándolos posteriormente en forma de cápsulas duras o tabletas. De todas las formas farmacéuticas mencionadas, las tabletas son las más estables, las que permiten mayor facilidad de dosificación y poseen un menor costo de producción, por lo que representan la forma farmacéutica más investigada actualmente a nivel mundial.

En función de estos antecedentes, en el trabajo se identificó como problema científico: “*La necesidad de desarrollar un fitofármaco con actividad antioxidante y hepatoprotectora para el Cuadro Básico de Medicamentos en el Sistema de Salud Cubano*” y se propone para su solución “*el desarrollo de una nueva formulación de tabletas, a partir del extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L y la evaluación de su actividad antioxidante y hepatoprotectora*”, como una alternativa para reducir la necesidad de medicamentos con las referidas actividades farmacológicas en el Sistema de Salud Cubano.

A partir de este problema se formuló la siguiente **Hipótesis de la investigación:**

Es posible desarrollar una nueva formulación de tabletas con actividad antioxidante y hepatoprotectora, a partir del extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.

El presente trabajo tuvo como **Objetivo General:**

Desarrollar una formulación de tabletas con actividad antioxidante y hepatoprotectora a partir del extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Para cumplimentar este objetivo general se trazaron los siguientes **Objetivos específicos:**

1. Estandarizar el extracto blando de las hojas de *Tamarindus indica* L.
2. Desarrollar tabletas por el método de granulación húmeda a partir del extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.
3. Evaluar la potencial toxicidad aguda oral y la irritabilidad de la mucosa oral producida por las tabletas de *Tamarindus indica* L en ratas Sprague Dawley y Hámster Sirio Dorado respectivamente.
4. Evaluar la actividad antioxidante de las tabletas de *Tamarindus indica* L en un modelo de intoxicación con tetracloruro de carbono, empleando ratas Sprague Dawley
5. Evaluar la actividad hepatoprotectora de las tabletas de *Tamarindus indica* L, frente al modelo de intoxicación hepática con tetracloruro de carbono en ratas Sprague Dawley.

Diversos aspectos destacan la **novedad científica** de los resultados de esta tesis:

1. Se obtiene por primera vez a nivel mundial, el extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L, un nuevo principio activo para la preparación de formulaciones farmacéuticas con actividad antioxidante y hepatoprotectora.
2. Se desarrolla por primera vez a nivel mundial, una forma farmacéutica sólida con propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes, a partir de extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.
3. Se aporta por primera vez a nivel mundial, elementos que evidencian la actividad del fitocomplejo de las hojas de *Tamarindus indica* L sobre la función hepática en una forma farmacéutica terminada.

La **importancia teórica** de esta tesis radica en el aporte de nuevos conocimientos sobre la actividad farmacológica de la especie ***Tamarindus indica* L**. En esta se aportan por primera vez los parámetros de referencia para el control de la calidad del Extracto Blando de ***Tamarindus indica* L**, nuevo Ingrediente Farmacéutico Activo y se establecen elementos teóricos que relacionan la acción sinérgica antioxidante y hepatoprotectora, con la riqueza de metabolitos bioactivos que contienen los extractos de las hojas de esta planta medicinal, en una forma farmacéutica terminada.

Desde el punto de vista **práctico** la investigación ofrece aportes **sociales y económicos**. La generalización de los resultados presentados en este trabajo representaría una vía para garantizar la terapia de pacientes con disfunciones hepáticas, y coadyuvará al tratamiento de otras enfermedades que transcurren asociadas al estrés oxidativo, como la polineuritis, las hiperlipidemias y la *diabetes mellitus* entre otras. La producción de estas formas farmacéuticas a cualquier escala podría constituir un ahorro por el concepto de sustitución de importaciones, pues deberían importarse menores cantidades de medicamentos con propiedades hepatoprotectoras en el Sistema de Salud Cubano.

La tesis cuenta con 97 páginas distribuidas en: introducción, revisión bibliográfica, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y recomendaciones. El trabajo contiene, además: una síntesis, una tabla de contenidos, las referencias bibliográficas consultadas, 20 tablas y 37 figuras.

Los resultados que reúne la presente investigación se han presentado en 8 eventos científicos internacionales y están incluidos en 9 artículos publicados en revistas nacionales e internacionales. Estos resultados han sido reconocidos como logro científico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (2007), premio en el Forum de Ciencia y Técnica Provincial (2011) y formó parte del dossier premiado como el logro científico de mayor aporte social de la Universidad de Oriente (2010), y como mejor resultado científico de la ANIR en la Facultad de Ciencias Naturales en el 2011. Esta tesis fue pre-defendida ante el Consejo Científico del Instituto Finlay, invitados del Consejo Científico de la Universidad de Ciencias Médicas “Victoria de Girón” y del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana.

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Fisiopatología de las lesiones hepáticas

I.1.1 Hígado. Estructura-función

El hígado es el órgano más grande del organismo humano, después de la piel. Posee una compleja estructura anatomofuncional, e interviene en múltiples procesos metabólicos tanto biosintéticos como catabólicos de sustancias nocivas exógenas y endógenas (Martin y col., 1985; Brines y Codoñer, 2006; Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología, Nutrición y Pediatría (SEGHNP), 2008). La mayor parte de sus células son hepatocitos, que constituyen aproximadamente dos tercios de la masa hepática. Estas células especializadas desempeñan numerosas funciones para mantener la homeostasis y la salud.

Entre las principales funciones metabólicas del hígado se encuentran la síntesis de la mayoría de las proteínas séricas esenciales, la producción de bilis y sus transportadores, la regulación del metabolismo de las diferentes biomoléculas y la posterior conjugación el metabolismo y conjugación de los compuestos lipófilos, para excretarlos por la bilis o la orina (Roca, 2007; SEGHNP, 2008).

I.1.2 Lesiones hepáticas

Entre las lesiones hepáticas más comunes se pueden citar las hepatitis víricas agudas A, B, C, D y E. Estas lesiones poseen diversos modos de transmisión y epidemiología. Producen ictericia e inflamación hepática difusa, que en la mayoría de los casos se resuelven espontáneamente. Otra enfermedad hepática común es la infección crónica por el virus de la hepatitis B. Esta infección normalmente no produce síntomas (Martin y col., 1985; Roca, 2007; SEGHNP, 2008).

La hepatitis crónica C, es una enfermedad necroinflamatoria persistente en el tiempo. Ocasiona una lesión progresiva del hígado, con riesgo de cirrosis a largo plazo. Se caracteriza por la replicación viral continuada en el hígado, con una permanente detección de viremia. La característica principal de la hepatitis crónica C es su mantenimiento en el tiempo y la progresión lenta de la fibrosis (Martin y col., 1985; SEGHNP, 2008).

La hepatitis medicamentosa y tóxica, es otra enfermedad hepática común. Es inducida por fármacos y sustancias tóxicas como el alcohol y otros agentes químicos como el tetracloruro de carbono (Martin y col., 1985; SEGHNP, 2008).

En las hepatopatías en general, se manifiesta hiperbilirrubinemia, sobre todo la directa o conjugada, y los niveles de alanina-aminotransferasa (ALT) y aspartato-aminotransferasa (AST) aparecen elevados, mientras que la fosfatasa alcalina mantiene sus valores normales. Sólo en los casos de hepatitis colestásica, se pueden encontrar niveles elevados de esta última enzima (Brines y Codóñer; 2006; Roca, 2007).

I.1.3 Pruebas del funcionamiento hepático

Muchas de las características clínicas de las lesiones hepáticas son inespecíficas. Por ello la realización de baterías de exámenes se ha convertido en el componente esencial para el diagnóstico del paciente. La alteración de los exámenes funcionales hepáticos permite clasificar la naturaleza del daño hepático en lesión hepatocelular, lesión colestásica y lesión mixta (Martin y col., 1985; Roca, 2007).

Las aminotransferasas (AST/ALT), se encuentran en concentraciones altas dentro de los hepatocitos, especialmente la ALT. Cualquier agresión que produzca lesión a las células hepáticas, produce un aumento en la concentración sérica de ALT. Un aumento de AST indica que el daño es estructuralmente más profundo, ya que el 90% de esta enzima se encuentra en las mitocondrias. Las aminotransferasas proporcionan una medida sensible, aunque no específica, de inflamación hepática (Martin y col., 1985; SEGHNP, 2008).

La elevación de los niveles de la fosfatasa alcalina sérica, puede indicar la existencia de una lesión colestásica, aunque deberá confirmarse con la determinación de los niveles de la gamma-glutamiltanspeptidasa. La elevación de las concentraciones séricas de estas dos enzimas indican lesión de las células de los conductos biliares. Otra biomolécula relacionada con la colestasis es la bilirrubina. El valor sérico de bilirrubina total es una medida de la función excretora y detoxificadora del hígado. Su incremento es signo de lesión colestásica (Saraswat y col., 1993).

La proteína más utilizada en el diagnóstico de la capacidad biosintética del hígado es la albúmina. Una baja concentración de albúmina indica deficiencia de la función biosintética hepática. Cuando la función hepática tiene anomalías graves, disminuyen la síntesis y la secreción de proteínas plasmáticas. Este hecho ha sido reportado en las intoxicaciones agudas con tetracloruro de carbono y fármacos como el paracetamol. En estos casos suele ocurrir hipoproteinemias como consecuencia del daño hepatocelular (Troncoso y Guija, 2007; Bihari y col., 2009; Hassan y col., 2010; Manjunatha y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011; Heba y col., 2011; Marin y col., 2011).

La determinación de lípidos totales es otro de los exámenes considerados en la evaluación del funcionamiento hepático, especialmente en ensayos donde se evalúa la capacidad de hepatoprotección de fármacos. En las lesiones hepáticas graves, el hígado suele inflamarse alterándose la permeabilidad de la membrana. Este daño incrementa la concentración de otras biomoléculas que normalmente se encuentran en bajas concentraciones en el suero (Martin y col., 1985).

Se ha observado en biomodelos experimentales que la cantidad de lípidos totales en hígado y suero aumentan en intoxicaciones por tóxicos químicos, especialmente con tetracloruro de carbono (CCl₄). El mecanismo de intoxicación hepática con el CCl₄ involucra el ataque a los lípidos de la membrana, haciendo ésta más suave y permeable, provocando el aumento de compuestos lipídicos en plasma (Surendra y Bodakhe, 2007; Bihari y col., 2009; Heba y col., 2011).

I.2 Estrés oxidativo y defensa antioxidante

En situaciones fisiológicas normales la célula presenta un estado redox característico. En estas condiciones, la cantidad de radicales libres o Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) es controlada por el sistema antioxidante endógeno. Sin embargo, existen diferentes situaciones fisiológicas en las que se altera el equilibrio a favor de las especies oxidantes, lo que da lugar al estrés oxidativo. De este modo, el estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de EROs y la protección antioxidante de la célula (Davies, 1995, Sies y Stahl; 1995; León y col., 2005; Marín y col., 2011).

Entre las EROs se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\bullet), los radicales peroxilo y alcoxilo (RO_2^\bullet , RO^\bullet), el ácido hipocloroso ($HOCl$), el oxígeno singlete 1O_2 , el óxido nítrico (NO^\bullet) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (Gill y col., 2010, Babich y col., 2011; Marín y col., 2011).

Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos enzimáticos que se encargan de eliminar las ERO, manteniendo el equilibrio redox celular (Evans y Halliwell, 2004; León y col., 2005; Babich y col., 2011).

Se ha informado una clasificación de la defensa antioxidante en tres sistemas según: sistema antioxidante enzimático endógeno, sistema antioxidante no enzimático endógeno y sistema antioxidante exógeno (Tabla I) (Boots y col., 2008). Entre las enzimas que se encuentran en el sistema antioxidante enzimático figuran la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. En el sistema no enzimático endógeno se destacan glutatión reducido (GSH), el ácido úrico, la albúmina, la bilirrubina y el ubiquinol o coenzima Q. Por su parte, en el sistema no enzimático exógeno se encuentran las vitaminas C y E, los compuestos polifenólicos y los micronutrientes (Sies y Stahl, 1995; Boots y col., 2008).

La actividad de las enzimas antioxidantes depende del equilibrio entre la inactivación y su inducción. Al respecto, la inducción mantenida de enzimas antioxidantes representaría un factor protector frente a la generación de radicales libres (Davies, 1995).

Los mecanismos no enzimáticos de origen endógeno y exógeno permiten contrarrestar la agresión oxidativa que causan los radicales libres. Los mecanismos no enzimáticos deben estar presentes en todos los compartimentos celulares y por esto algunos antioxidantes son hidrosolubles como la vitamina C, el GSH y la albúmina y otros son liposolubles como los β -carotenos y las vitaminas A y E (Fernández-Checa y col., 1997; Hill y col., 2003; López y Suárez, 2010).

El glutatión o GSH aparece en el hepatocito en altas concentraciones y posee actividad antiradicalaria manifestada a través del secuestro de radicales libres (Lu, 1999; Viña y col., 2004). En presencia de una GSH peroxidasa selenio-dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera endógena. Este antioxidante es particularmente importante en la mitocondria, orgánulo especialmente susceptible al

Tabla I. Principales sistemas encargados de mantener el balance redox en el organismo y sus funciones fundamentales a nivel celular

Antioxidantes	Función
Sistema antioxidante enzimático endógeno	
Superóxido dismutasa (SOD)	Eliminación del radical superóxido
Catalasa	Eliminación de hidroperóxidos
Glutación peroxidasas (GPx)	Eliminación de hidroperóxidos
Glutación reductasa (GRed)	Reducción de glutación oxidado
Glutación-S-transferasa (GST)	Eliminación de peróxidos lipídicos
Metionina sulfóxido reductasa	Reparación de residuos oxidados de metionina
Peroxidasas	Descomposición de H ₂ O ₂ y peróxidos lipídicos
Sistemas antioxidantes no enzimáticos endógenos	
Glutación reducido (GSH)	Sustrato de las enzimas GPx y GST y captador de radicales libres
Ácido úrico	Secuestra el oxígeno singlete y otros radicales libres
Albúmina	Actividad peroxidasa en presencia de GSH
Bilirrubina	Secuestrador de radicales peroxilo
Ubiquinol (Coenzima Q)	Secuestrador de radicales libres
Ácido α -lipoico	Secuestrador de radicales libres OH•, O ₂ ^{•-} y H ₂ O ₂
Antioxidantes no enzimáticos exógenos (Obtenidos en la dieta)	
Ácido ascórbico (vitamina C)	Regeneración de tocoferoles e inactivación de radicales libres
α -Tocoferol (vitamina E)	Protección de membranas e inactivación del OH•
Compuestos fenólicos	Secuestrador de radicales libres y actividad quelante de metales

Adaptado de Boots y col., 2008

daño oxidativo, dado en que no presenta la enzima catalasa (De Leve y Kaplowitz, 1991; Fernández-Checa y col., 1992).

En función de su importancia para el mantenimiento del balance redox del organismo, diferentes enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa así como otras sustancias como por ejemplo el glutatión reducido son utilizadas para evaluar el estado redox celular. En el caso de la peroxidación lipídica el marcador más utilizado internacionalmente es el malonildialdehído (MDA) (Hassan y col., 2010; Heba y col., 2011; Manjunatha y col., 2011).

I.2.1 Estrés oxidativo hepático

Cuando las células hepáticas son expuestas a un exceso de ERO, se afectan las funciones celulares (Kaplowitz, 2000), ya que se altera la permeabilidad de la membrana y las consecuencias pueden ser letales (Kaplowitz y Tsukamoto, 1996).

Al enfrentarse el hepatocito al estrés oxidativo se produce el daño celular. Se ha observado peroxidación lipídica y citotoxicidad a nivel de membrana (Catalá, 2009; Heba y col., 2011); así como daño oxidativo al ADN (Dizdaroglu y col., 2002) proteínas (Virág y col., 2003; Valko y col., 2007) y glúcidos (Marín y col., 2011). La peroxidación lipídica iniciada por las EROs, juega un papel importante en la fibrogénesis hepática. Una suplementación dietética de vitamina E ejerce un efecto protector con relación a la fibrosis hepática inducida por CCl₄ (Britton y Bacon, 1994; Deulofeu y col., 2000). Aunque el daño celular en las enfermedades hepáticas humanas es multifactorial, las EROs juegan un papel importante en la iniciación o en el restablecimiento de este daño (Britton y Bacon, 1994).

Se ha informado que la administración de sustancias con actividad antioxidante, capaces de inhibir la peroxidación lipídica a nivel de la membrana celular, también protegen la funcionalidad del hígado (Surendra y Bodakhe, 2007; Bihari y col., 2009; Adeneye y Brittain, 2009; Heba y col., 2011, Marín y col., 2011). Un número elevado de sustancias ha sido ensayado en los últimos años con esta finalidad. Casi todas son de origen vegetal, jugando un papel protagónico los polifenoles y flavonoides, los aceites esenciales, los triterpenos, los ácidos grasos poliinsaturados, las vitaminas y los micronutrientes como el cinc y el selenio (Heba y col., 2011; Marín y col., 2011).

I.2.2 La intoxicación con tetracloruro de carbono

De especial interés en esta investigación resulta el mecanismo a través del cual se produce la intoxicación hepática con tetracloruro de carbono, el cual ocurre vía peroxidación lipídica (Takate y col., 2010; Lewis y Mohanty, 2010; Manjunatha y col., 2011; Heba y col., 2011; Saha y col., 2011). La administración oral de tetracloruro de carbono es una de las técnicas más utilizadas para evaluar la efectividad de sustancias hepatoprotectoras, frente a diferentes de agentes tóxicos (Hassan y col., 2010; Bhoomannavar y col., 2011).

La figura 1 presenta un esquema del proceso de peroxidación lipídica inducida por el tetracloruro de carbono. El tetracloruro de carbono se acumula en los hepatocitos, donde es activado por oxidasas que catalizan la ruptura del enlace C-Cl para formar el radical libre triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$). Este radical reacciona con el oxígeno molecular para producir el triclorometil peroxilo ($\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$) que causa la oxidación de los ácidos grasos insaturados (dienos conjugados presentes en la membrana lipídica), que contienen entre cada doble enlace un grupo $-\text{CH}_2-$ muy reactivo y por reacción con el oxígeno produce los peróxidos orgánicos (peroxidación lipídica). Esta reacción es autocatalítica (Deshwal y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011).

Debido a la peroxidación de los lípidos de la membrana, ocurre una rápida afectación de la estructura y función del retículo endoplasmático. En menos de 30 minutos declina la síntesis proteica hepática y en dos horas se produce la tumefacción del retículo endoplasmático liso y la disociación de los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso, aumentando la permeabilidad de la membrana. El hígado pierde la capacidad de sintetizar apoproteínas para acomplejar los triglicéridos y por tanto, se reduce la secreción de lipoproteínas, resultando en un fenotipo de hígado graso. Ocurre además daño a nivel mitocondrial, seguido del hinchamiento progresivo de la célula por el incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, asociado a influjo masivo de calcio y finalmente se produce la muerte celular. Este daño se asocia a la relativa estabilidad de los aldehídos grasos que se producen en el retículo endoplasmático liso durante la peroxidación lipídica, pero que pueden actuar en sitios distantes (Patel y Shah, 2009).

Una consecuencia de la intoxicación con tetracloruro de carbono, es el decrecimiento de la actividad de las enzimas microsomales. Las enzimas hidrosolubles se filtran al plasma desde el hígado y comienzan a aparecer niveles elevados en el plasma. La intoxicación por tetracloruro de carbono es un modelo experimental ideal para la evaluación de actividad antioxidante y hepatoprotectora, pues produce peroxidación lipídica y genera una gran cantidad de ERO que afectan la función hepática. Esto permite evaluar la funcionalidad del hígado en biomodelos experimentales (Recknagel, 1983; Takate y col., 2010; Lewis y Mohanty, 2010; Manjunatha y col., 2011; Heba y col., 2011, Saha y col., 2011).

I.3 Tratamiento de las enfermedades hepáticas

A pesar de que existe el riesgo de que algunas enfermedades hepáticas, puedan progresar a hepatitis crónica, no existen tratamientos etiológicos establecidos para las mismas (Roca, 2007; Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología, Nutrición y Pediatría, 2008). Las opciones terapéuticas para las hepatopatías son escasas a nivel mundial y en raras ocasiones es curativo. Por ejemplo, el tratamiento de la hepatitis crónica B consiste en prevenir el desarrollo de una hepatopatía grave y/o mejorar al paciente que ya tiene una hepatopatía grave.

En la hepatitis crónica C, el tratamiento consiste en la aplicación de monoterapia con interferón alfa (INF- α), y el uso combinado de este y ribavirina. En la mayoría de países el tratamiento carece de autorización para su empleo en niños. Algunas enfermedades hepáticas, como la cirrosis y la degeneración grasa, son de difícil tratamiento y se obtienen limitados resultados (SEGHNP, 2008). En Cuba no existen medicamentos hepatoprotectores, y por esta razón se necesitan nuevos agentes terapéuticos, con baja incidencia de efectos secundarios. Así, el uso de plantas medicinales constituye una alternativa terapéutica de gran utilidad para estas patologías.

La planta medicinal que utiliza preferentemente la población cubana, para el tratamiento de las hepatitis y otras lesiones hepáticas es el *Tamarindus indica* L (Roig, 1988). La parte más utilizada son las hojas, que se consumen en forma de

decocciones a razón de 4 a 5 litros por día, aunque algunas personas utilizan la corteza.

I.4 *Tamarindus indica* L: composición fitoquímica y evaluaciones fármaco toxicológicas

I.4.1 Generalidades

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es una especie monogenérica cuya ubicación taxonómica según *The Angiosperm Phylogeny Group* es: Reino: *Plantae*; Subclase: *Rosidae*; Supraorden: *Eurosidae*; Orden: *Fabales*; Familia: *Fabaceae*; Subfamilia: *Caesalpinioideae*; Género: *Tamarindus*; Especie: *Tamarindus indica* Linneo (*Angiosperm Phylogeny Group*, 2003).

Es un árbol inerte de hasta 25 m de altura. El tronco puede alcanzar hasta 1,5 m de diámetro. Posee ramas extendidas en forma circular. Las hojas alternas y pinnadas miden entre 6 y 12 cm de largo y están formadas por muchos pares de folíolos lineales de hasta 20 mm de longitud. Es una planta longeva que puede superar los 100 años de edad. Se desarrolla preferentemente en suelos de pH comprendido entre 6,5 y 7,5, aunque puede hallarse incluso en suelos ácidos y pobres en nutrientes. Tolerancia desde un suelo aluvial profundo, hasta suelos rocosos y porosos. (Cecchini, 1983)

Se ha informado la utilidad etnobotánica para todos sus órganos del ***Tamarindus indica*** L. Al fruto se le atribuyen propiedades antipiréticas y antiescorbúticas y es empleado en enfermedades relacionadas con el exceso de colesterol y ácido úrico. Los retoños se consumen en la disentería y en infecciones bucales y la corteza del tallo contra el asma y la amenorrea. Las hojas y las semillas como vermífugas, estomáquicas y para el tratamiento de enfermedades renales (Roig, 1988; Gueye, 2007; Adama, 2010). Las hojas y el tallo se usan en enfermedades hepáticas, ictericia y hemorragias. La corteza y las hojas son empleadas en África Central en el tratamiento del parasitismo intestinal (Havinga, 2010). Casi todas sus partes son empleadas como laxante, antipiréticas, antisépticas o antimicrobiana, antimaláricas, antiartríticas, antidiabéticas, entre otras muchas aplicaciones. La pulpa del fruto ha sido incluida como una droga oficial en la Farmacopea de los Estados Unidos de América y en la Farmacopea Británica (Martindale, 1993).

I.4.2 Composición fitoquímica

Se ha informado en las hojas de *Tamarindus indica* L. la presencia de proteínas (4.0-5.8%), grasas y aceites (1.2-2.1%), fibra bruta (1.9-3.0%), carbohidratos totales (16-18%). Se ha informado también la presencia de vitaminas como tiamina y riboflavina (0.1-0.2 mg/g), niacina (1.5-4.1 mg/g), vitamina C (3.0-6.0 mg/g) y aproximadamente 2.5 mg/g de β -caroteno. Han sido reportados además, los niveles de algunos metales como calcio (101-250 mg/g), magnesio (71 mg/g), fósforo (140 mg/g), hierro (2.0-5.2 mg/g), cobre (2.0 mg/g), cloro (94 mg/g), azufre (63 mg/g), sodio (8 mg/g) y potasio (270 mg/g) (Lewis y Neelakantan, 1964; Anon, 1976).

En 1998 se propuso una norma cubana para el control de la calidad del *Tamarindus indica* L, droga cruda. El tamizaje fitoquímico de las hojas de ***Tamarindus indica* L.** permitió identificar de forma cualitativa, las sustancias mayoritarias presentes en los extractos, entre las cuales se destacan triterpenos, esteroides, quinonas, aceites esenciales, flavonoides, grasas fijas, fenoles y taninos, azúcares reductores, saponinas y aceites esenciales (Lores y col., 1998).

En la Universidad de Oriente desde principios de 1990, se han realizado estudios relacionados con la utilidad de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L. a fin de validar su utilidad etnobotánica como antioxidante, hepatoprotector (Escalona y col., 1995, Medina, 2001) y como antimicrobiano (Escalona y col., 2010^a).

En la tabla II se presenta el resultado de un estudio por cromatografía de gases/cromatografía de masas, en extractos obtenidos por hidrodestilación, en los que se detectó la presencia de varios aceites esenciales y compuestos volátiles.

Se ha identificado además, la composición elemental de los extractos, encontrándose fundamentalmente aluminio, cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo, estroncio, cinc, molibdeno, vanadio y selenio (Escalona y col, 2010^b).

Los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos de las hojas son apigenina, ácidos ferúlico y cafeico, luteolina-7-O-glucósido, luteolina, rutina y vicenina; además de los flavonoides C-glicosídicos orientina, isorientina, isovitexina y vitexina (Dehesa y col., 2005; 2006). Se ha informado también la presencia de los triterpenos lupeol y lupanona (Iman y col., 2007).

Tabla II Compuestos volátiles y aceites esenciales identificados en las hojas de *Tamarindus indica* L.

Compuesto	C_(x) (%)	
<i>p</i> -Cimeno	4.76	Hojas secadas al sol y extraídas en Soxhlet con cloroformo (Pino y col., 2002)
Limoneno	9.05	
Éter difenílico	5.47	
Longifoleno	7.51	
α -Cariofileno	5.56	
2,6-di- <i>ter</i> -butil-4-metil fenol (BHT)	7.24	
Metil 3,5-di- <i>ter</i> -butil-4-hidroxibenzoato	2.76	
Éster metílico del ácido palmítico	6.41	
Farnesilcetona	2.93	
Antranilato de linalool	3.96	
3-Eicosino	4.62	
Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	2.26	
Fitol	4.06	
Éster metílico del ácido 7,10-octadecadienoico	3.49	
Ácido oleico	2.83	
Criptopinona	5.28	
Éster metílico del ácido 15-tricosenoico	8.39	
β -Sitosterol	4.25	
2-hexanal	1.7	Hojas frescas, hidrodestilación y extracción con cloroformo (Escalona y col., 2010)
α -pineno	1.0	
β -pineno	1.4	
(E)- β -cimeno	Trazas	
Linalool	1.0	
α -terpineol	0.7	
Nerol	1.0	
Benzoato de bencilo	40.6	
Pentadecanol	8.2	
Hexadecanol	12.4	
Linalool	1.0	
Antranilato de linalool	4.7	
Limoneno	24.4	

Un estudio de la dinámica de acumulación mensual de flavonoides en las hojas sugirió, que en el mes de marzo es donde se alcanza la mayor acumulación de estos metabolitos (Escalona y col., 2011^b). Se comprobó que los meses de enero-abril (etapa de fructificación), son los de mayor producción de metabolitos secundarios en la planta, específicamente polifenoles, flavonoides y carbohidratos, así como elementos metálicos como selenio, cobre y cinc (Escalona y col., 2010^b).

I.4.3 Actividad farmacológica de las hojas de *Tamarindus indica* L.

El extracto fluido de tamarindo modula la producción de óxido nítrico en presencia de toxicidad aguda con tetracloruro de carbono, en ratones Balb/c (Ramos y col., 2003) y atenúa el efecto hepatotóxico provocado por esta sustancia en ratas Wistar machos, inhibiendo el incremento de la concentración de peróxidos lipídicos y de las aminotransferasas séricas (Medina, 2001).

Un estudio informó el efecto significativo en la regeneración hepática de los extractos acuosos de diferentes partes de la planta en ratas Wistar (Pimple y col., 2007). La tintura de las hojas al 30% incrementa el volumen de orina en ratas Wistar machos. Este efecto diurético es similar al producido por la furosemida, tanto por el volumen producido, como por las características fisicoquímicas de la orina (Martínez, 2007).

En Cuba no existían informes de actividad antimicrobiana para las hojas de *Tamarindus indica* L. Una investigación reciente refirió la actividad antimicrobiana de las hojas de la especie, concluyendo que el extracto fluido de tamarindo es mucho más activo que las fracciones individuales (Escalona y col., 2010^a). En este trabajo se demostró *por primera vez para esta especie* que la actividad del extracto total es más potente que la de sus fracciones por separado.

El extracto acuoso de las hojas de *Tamarindus indica* L. mostró actividad hepatoprotectora, en el modelo de intoxicación por terbutilhidroperóxido, donde se demostró además su actividad antiradicalaria frente al radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Bathia y col., 1966).

La actividad hepatoprotectora ha sido referida además para un extracto de las hojas en etanol al 50%. En este trabajo se evaluó y comparó su actividad con la de otros ocho extractos procedentes de plantas del Caribe con reconocida actividad

hepatoprotectora y antioxidante. El extracto de las hojas de ***Tamarindus indica* L** resultó el segundo más activo, superior incluso al *Rosmarinus officinalis* (Joyeux, 1995), una de las catorce especies incluidas en el *Green Pharmacy Herbal Handbook* para el tratamiento de las disfunciones hepáticas.

Investigaciones desarrolladas en Cuba demostraron el efecto hepatoprotector de un extracto hidroalcohólico al 80% de hojas de tamarindo en un modelo de intoxicación hepática por tetracloruro de carbono (Dehesa, 2005). En este estudio, se emplearon modelos de intoxicación hepática que implican en el mecanismo de toxicidad la formación de radicales libres. En dos de ellos, se determinó la actividad del extracto ensayado ante el DPPH y la inhibición del radical superóxido. Estos resultados sugieren que las hojas del tamarindo ejercen su efecto hepatoprotector mediante un mecanismo antioxidante. En este trabajo se afirma que los fenoles y flavonoides son los compuestos responsables de la actividad antioxidante de los extractos de las hojas de esta especie (Dehesa, 2005).

La presencia de una gran heterogeneidad fitoquímica, se asocia con una importante actividad antioxidante, que ya ha sido informada para estos metabolitos en diferentes contextos. La tabla III relaciona los principales metabolitos identificados para las hojas de ***Tamarindus indica* L** con la actividad antioxidante informada para los mismos.

Esta diversidad molecular pudiera relacionarse con una potencial actividad sinérgica antioxidante, que fue recientemente demostrada cuando se comprobó en varios ensayos antioxidantes *in vitro*, a nivel químico y celular que la actividad de fracciones de polifenoles aisladas del extracto fluido de de ***Tamarindus indica* L**, resultó menor en comparación con el extracto total (Escalona y col., 2011^b).

El resultado de la acción sinérgica de todos estos componentes con respecto a su actividad antioxidante, resulta compatible con los postulados de otros investigadores en la justificación de la actividad antioxidante de extractos de otras especies vegetales (Weng y Gordon, 1993; Miguez y col., 1994; Pedrielli y Skibsted, 2002; Hai, 2004). Ello es válido también para mezclas binarias de sustancias como la del α -tocoferol y el β -sitosterol (Finotti y col., 2000), la de los ácidos cafeico y ferúlico con

Tabla III. Principales metabolitos presentes en extractos de las hojas de *Tamarindus indica* L. con la actividad antioxidante demostrada.

Metabolitos	Actividad demostrada
Ácidos cafeico y ferúlico	Inhibición de la formación de mediadores de la inflamación, Secuestradores de los radicales libres (Hong y Tang, 1997; Yeon y col., 2011)
Flavonoides (Orientina, Isoorientina, Vitexina e isovitexina)	Actividad antioxidante en modelos <i>in vivo</i> (Iftekhar y col., 2006; Martinelo y col., 2006; Pimple, 2007; Lewis y Mohanty, 2010; Heba y col., 2011; Betancourt y col., 2011; Marín y col., 2011). Poseen una gran afinidad por los lípidos de membrana protegen frente a la peroxidación (Hodnick y col., 1988; Muraoka y col., 2002) Actúan sinérgicamente con la vitamina E, a nivel de membrana (Sreelatha y col., 2009; Amin and Ghoneim, 2009).
Aceites esenciales	Secuestran radicales libres (Milán, 2006; Sari y col., 2006; Misharina y Polshkov, 2006; Krishnaiah y col., 2007; Graça, 2010). Actúan sinérgicamente con los polifenoles (Kulevanova y Kadifkova, 2001; Naderi y col., 2004)
Triterpenos (lupeol y lupanona)	Inhiben la dehalogenación del CCl ₄ , que produce el citocromo P ₄₅₀ 2E1 (Koop, 1992; Zangar y col., 2000), Poseen una marcada actividad secuestradora de radicales libres (Takeoka y Dao, 2003; Lee y col., 2007)
Ácido ascórbico	Especial función en la protección de la membrana celular. Su estructura le permite secuestrar el radical OH [•] libre y el que se encuentra unido a la vitamina E en el radical α -tocoferoxil, restaurando la actividad que pierde esta vitamina cuando reacciona con el radical OH [•] . (León y col., 2005, Omar y col., 2009).
Vitamina E	Principal antioxidante en el tejido graso y como la principal defensa frente a la peroxidación lipídica, impidiendo la propagación de los radicales libres (Ricciarelli y col., 2001).

Tabla III. Continuación.

Metabolitos	Actividad demostrada
Ácidos grasos (palmítico y oleico)	Inhiben la producción de radicales libres por un doble mecanismo: bloqueo de la transferencia de protones entre el ADP y el ATP, y protegen a las lipoproteínas de los mediadores de la peroxidación lipídica (Parthasarathy y col., 1990).
β-sitosterol	MODula la relación GSH reducido/GSH oxidado, Incrementa la actividad de las enzimas superóxido dismutasa dependiente de manganeso y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Vivancos y Moreno, 2005).
Selenio	Inhibe la peroxidación lipídica (Loguercio y Federico, 2003) y Cofactor de una de las enzimas de la primera línea de defensa redox: la glutatión peroxidasa Clark y col., 1996) Mantiene niveles bajos de las grasas saturadas e insaturadas en suero (Newairy y col., 2007), Cofactor de la glutatión peroxidasa y tioredoxina reductasa. Estas enzimas potencian actividad, induciendo la generación de otras enzimas como la superóxido dismutasa (Venardos y col., 2004; Karunasinghe y col., 2006).
Cobre y cinc	Cofactores de enzimas del sistema de defensa redox (Clark y col., 1996, Newairy y col., 2007)
Butilhidroxitolueno (BHT)	Tiene un comportamiento análogo a la vitamina E (Burton y col., 1981)

sus respectivos ésteres fenílicos (Hong y Tang, 2004; Yeon y col., 2011) y la del selenio con la vitamina E (Aboul-Soud, 2011), entre otros estudios.

I.4.4 Estudios toxicológicos de hojas de *Tamarindus indica* L.

El empleo del tamarindo por el hombre data de fechas anteriores a nuestra era, por lo que la experiencia práctica acumulada sobre el uso de esta especie apunta hacia una relativa baja toxicidad. No obstante, un informe presentado por el Centro de Toxicología y Biomedicina de Santiago de Cuba (TOXIMED) refiere que el extracto fluido en etanol al 72 % de hojas de *Tamarindus indica* L, posee una irritabilidad baja de la mucosa oral (Informe de investigación, TOXIMED 2009^b). Adicionalmente se refiere que el extracto fluido no produce toxicidad aguda oral, lo que implica, que esta forma farmacéutica "NO clasifica" como tóxica por esta vía (Informe de investigación, TOXIMED, 2009^a), permitiendo su utilización como materia prima para la formulación de otras formas farmacéuticas.

Sin embargo, el extracto fluido de *Tamarindus indica* L tiene la desventaja de poseer un alto contenido alcohólico, lo que limita su utilidad en el tratamiento de las hepatopatías, debido a la hepatotoxicidad de esta sustancia (Cederbaum y col., 2009). Por otra parte, el extracto fluido de tamarindo es astringente y ácido al paladar.

Los extractos fluidos y tinturas de productos naturales, se preparan generalmente en forma de jarabe o elixir. Sin embargo, desde el punto de vista biofarmacéutico, y según las patologías a las que se destinará el uso del extracto fluido de *Tamarindus indica* L, la preparación de una forma farmacéutica líquida no resulta una alternativa adecuada, por la presencia de un alto contenido de etanol en el extracto y la posible utilización de sacarosa en la formulación. Estos elementos justificarían la concentración del extracto fluido a extracto blando, con lo que se eliminaría el etanol presente, lo que posibilitaría la formulación de fitofármacos en forma sólida, productos ideales para eliminar los inconvenientes que, desde el punto de vista biofarmacéutico, presenta el extracto fluido original.

I.5 Las formas farmacéuticas con productos naturales

Existe una gran variedad de formas farmacéuticas en la literatura científica. Si se

clasifican por su estado físico en sólidas y líquidas, se puede afirmar que las formas sólidas poseen ventajas con relación a las formas líquidas, siendo las principales su exactitud en la dosificación, una mayor estabilidad y un reducido costo de producción. A pesar de estas ventajas, la mayoría de los medicamentos preparados con extractos vegetales, se presentan en forma líquida. En el nuevo Formulario Nacional de Fito y Apifármacos cubano, aproximadamente el 98 % de las formas farmacéuticas descritas son líquidas, y fundamentalmente jarabes y tinturas (Formulario Nacional de Fito y Apifármacos; 2010).

Desde el punto de vista biofarmacéutico, las formas farmacéuticas líquidas son más biodisponibles que las formas farmacéuticas sólidas, pero su estabilidad es mucho menor, los volúmenes a consumir son generalmente grandes y los costos de fabricación y transportación son altos, lo contrario ocurre a las formas farmacéuticas sólidas. Por estas razones en los últimos años se ha observado un crecimiento en las investigaciones relacionadas con el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas, a partir de extractos de origen natural, teniendo un papel destacado en este sentido las relacionadas con el desarrollo de tabletas.

I.5.1 Etapa de preformulación

En esta etapa se asegura la compatibilidad del principio activo con los posibles excipientes a utilizar en la formulación. Se evalúa cómo influyen en las propiedades del principio activo, factores como la temperatura, la luz y la humedad relativa, entre otros. En esta etapa se seleccionan los posibles excipientes que formarán parte de la formulación final, el envase en que se mantendrán almacenadas las formas farmacéuticas terminadas, y las condiciones de almacenamiento y conservación. En sentido general, esta fase permite al tecnólogo farmacéutico obtener elementos consistentes para proseguir la investigación de la formulación y su posterior optimización (Banker y Rhodes, 2002; Adeneye y Brittain, 2008).

El proceso de preformulación resulta determinante cuando se formulan tabletas con extractos naturales, ya sean extractos secos o blandos. Estos últimos son los más utilizados en la fabricación de tabletas y deberán estandarizarse antes de comenzar los estudios de preformulación y formulación (Sharapin, 2000).

I.5.2 Diseños de experimento

Para evaluar las cantidades de excipientes a utilizar en una formulación es posible tener cientos de combinaciones, que de realizarse todas se perdería mucho tiempo y esfuerzo. Un correcto diseño experimental permite obtener una gran cantidad de información con un reducido número de ensayos (Montgomery, 2000; Gabrielsson y col., 2002).

Los diseños que más se utilizan en la industria farmacéutica para el desarrollo de formulaciones de medicamentos son los diseños de mezcla. Éstos permiten conocer cómo la variación de las proporciones de los excipientes, incide sobre los índices de calidad de las formas terminadas (Ericsson y col., 1998; Gabrielsson y col., 2002; Fernández y col., 2008). El diseño D-Optimal es un tipo de diseño de mezcla que garantiza que los puntos experimentales minimicen la varianza de las variables respuestas (Gabrielsson y col., 2002). Este puede emplearse en estudios de espacios restringidos cuando se utilizan cantidades prefijadas entre un límite inferior y uno superior de tres o más excipientes (Ericsson y col., 1998; Fernández y col., 2008), característica que lo hace ideal para optimizar las formulaciones.

Existen diferentes técnicas disponibles para abordar los problemas de optimización en la Industria Farmacéutica. El método de Myers y Montgomery (Myers y Montgomery, 1995; Montgomery, 2000), conocido como método de múltiples respuestas o **Deseabilidad** es el más utilizado en la actualidad. La deseabilidad es una función objetivo que establece rangos desde 0 hasta 1 (menor deseabilidad hasta la máxima deseabilidad u objetivo). Este método numérico de optimización encuentra puntos que maximizan la deseabilidad, donde las características del objetivo se modifican ajustando el peso o importancia que se le da a cada una de las respuestas en la función.

I.5.3 Etapa de formulación

En esta etapa y fundamentado en el estudio de preformulación, el tecnólogo escoge los excipientes que formarán parte de la formulación de tabletas, selecciona el sitio óptimo para la liberación del fármaco y el método de fabricación. Además se realizarán estudios *in vitro* e *in vivo* que garanticen que el principio activo pueda

ejercer la actividad farmacológica y que la estabilidad de la forma farmacéutica terminada se mantenga en el tiempo.

Después de seleccionar los excipientes que formarán parte en la formulación, el tecnólogo debe evaluar diferentes cantidades de cada uno de ellos (diferentes formulaciones), auxiliándose de diseños experimentales adecuados; hasta lograr la combinación que garantice la seguridad, biodisponibilidad y la estabilidad de la forma farmacéutica final (Iraizoz y col., 1992; Banker y Rhodes, 2002; Gibson, 2005).

I.5.4 Estudios de estabilidad

El objetivo de un estudio de estabilidad es determinar el período de tiempo de almacenamiento en unas condiciones especificadas, en las que el producto todavía se encuentra dentro de las especificaciones establecidas. La estabilidad es un factor esencial de la calidad, seguridad y eficacia de un medicamento. Una tableta que no tiene una estabilidad suficiente puede producir cambios en el estado físico (dureza, velocidad de disolución, humedad, altura etc.); así como en las características químicas, pudiendo ocurrir la formación de sustancias de descomposición de alto riesgo para la salud (Sbarbati, 2000; *European Agency for The Evaluation of Medicinal Product* (EMA), 2002; CECMED Reg. 29/02; 2002). La pérdida de estabilidad de un fármaco provoca que se afecte la pureza, potencia y la seguridad en su uso (Sbarbati, 2000).

El estudio de estabilidad consiste en una serie de pruebas para asegurar que la calidad de un medicamento se mantiene dentro de las especificaciones, en las condiciones de envase, embalaje y almacenamiento durante un período de tiempo especificado. Los estudios de estabilidad explican la influencia de muchos factores en la estabilidad física, química, microbiológica y biofarmacéutica de los medicamentos (EMA, 2002).

Por ejemplo, la estabilidad de una tableta farmacéutica puede verse afectada por diversos factores, dentro de los que destacan la humedad y la temperatura, que pueden afectar de manera general todas las propiedades tecnológicas de las tabletas (Yoshioka y Stella, 2002). Otras propiedades muy importantes que se alteran comúnmente, afectando la estabilidad de las tabletas farmacéuticas son, el tiempo de

desintegración y la velocidad de disolución, que modifican la cantidad del principio activo que se libera y por tanto afectan la biodisponibilidad de las tabletas (Sbarbati, 2000; Yoshioka y Stella, 2002). Aunque no siempre se encuentra una correlación entre la biodisponibilidad *in vitro* e *in vivo* (CDER, 1997), estas pruebas son herramientas que utiliza el tecnólogo farmacéutico, para el desarrollo de tabletas y otras formas farmacéuticas sólidas (Iraizoz y col., 1992; USP, 2007) como criterios de biodisponibilidad *in vitro*.

I.6 Tabletass o comprimidos

Durante el proceso de formulación de tabletas el tecnólogo farmacéutico asegura que la misma posea la cantidad correcta de principio activo, para que éste se libere en el tiempo a la velocidad necesaria y en el sitio adecuado. Se garantiza además, que las características fisicoquímicas exigidas al producto se mantendrán en el tiempo (Iraizoz y col., 1992). La formulación de tabletas, al igual que cualquier otra forma farmacéutica, pasa por tres etapas: preformulación, formulación y estudios de estabilidad.

I.6.1 Métodos de preparación de tabletas

Existen tres métodos generales de fabricación de tabletas: compresión directa, la granulaci3n seca o doble compresión y la granulaci3n húmeda. La compresión directa es el método más sencillo, sin embargo es muy exigente desde el punto de vista de las características físico-mecánicas de las materias primas que se van a utilizar (Lieberman y Lachman, 1984; Vila, 2000; Banker y Rhodes, 2002; Gibson, 2005).

La granulaci3n seca o doble compresión es un método que se utiliza para granular masas de polvos que contienen un principio activo que se altera con la humedad o el calor, pues como su nombre lo indica, se logra preparar el gránulo sin la utilizaci3n de disolventes, a través de procesos de compresión y molinado (Lieberman y Lachman, 1984; Iraizoz y col., 1992).

El método más empleado es la granulaci3n húmeda. En este método se logra el gránulo mezclando la masa de polvos con una soluci3n aglutinante, secando y degranulando la masa seca. Resulta ideal para la fabricaci3n de tabletas con

extractos vegetales blandos, ya que se puede utilizar el contenido líquido de los mismos en el proceso de granulación (Sharapin, 2000).

I.6.2 Propiedades de los granulados

El objetivo de la preparación de granulados es obtener un grano que fluya y comprima bien. Las propiedades que se evalúan en los granulados para la fabricación de tabletas, son entre otras no menos importantes: densidades aparentes de vertido (D_v) y de asentamiento (D_a), velocidad de flujo (V_f), ángulo de reposo (A_r), tamaño (T_P) y distribución de tamaño de partícula y humedad residual (H_r). Con las densidades se calculan además, los índices de Hausner (R_H) y compresibilidad (I_C), que ofrecen información sobre las propiedades reológicas de los granulados. En la tabla IV se presenta un resumen de la información que provee al tecnólogo farmacéutico cada una de estas propiedades durante el proceso de preparación de los granulados.

I.6.3 Propiedades de las tabletas

Una vez que se ha evaluado la calidad de los granulados, se seleccionan aquellos con mejores propiedades y se procede a los estudios de compresión para evaluar la calidad de las tabletas que se obtienen a partir de los mismos. Las propiedades que comúnmente se evalúan a las tabletas son:

Propiedades organolépticas

Olor: olores desagradables o cambios en el olor indican problemas de estabilidad en la tableta. Si el principio activo presenta un olor desagradable este debe ser enmascarado (Iraizoz y col., 1992; Vila, 2000).

Apariencia: La apariencia de una tableta es de gran importancia, pues resulta esencial para la aceptación por el paciente. Esta característica está muy relacionada con el proceso de compresión y las propiedades del principio activo. La apariencia macroscópica de una tableta está determinada por la forma, tamaño, color y las marcas. Todas estas propiedades contribuyen a satisfacer la expectativa que tienen los pacientes de un medicamento adecuado. La apariencia microscópica como la

Tabla IV. Propiedades que se deben evaluar a un granulado para conocer su aptitud para ser comprimido.

Propiedad	Información que provee
Densidad de vertido (Dv)	Expresa la capacidad de una masa de granulado para asentarse por su propio peso. Se plantea que debe ser mayor de 0.2 g/ml (Iraizoz y col., 1992) y se calcula por la relación masa / volumen de vertido (Iraizoz y col., 1992; USP, 2007).
Densidad de asentamiento (Da)	Expresa la capacidad del granulado de compactarse cuando es sometido a vibraciones o golpeteos sobre el recipiente que lo contiene. Se plantea que debe ser menor de 0.7 g/ml (Iraizoz y col., 1992) y se calcula por la relación masa / volumen de asentamiento (Iraizoz y col., 1992; USP, 2007).
Índice de compresibilidad (IC) e Índice de Hausner (RH)	Son medidas indirectas del flujo y la compresibilidad de los granulados. Se relacionados con la fricción interparticular de los granulados. El IC ha sido propuesto como una medida indirecta de la densidad de vertido, la forma y el tamaño de partícula, el área superficial, el contenido de humedad (USP, 2007). Se considera buen valor de IC aquellos que se encuentran por debajo de 15 %, mientras que para RH, se consideran buenos, aquellos cercanos a 1.1. (USP, 2007, BP, 2009)
Angulo de reposo (Ar)	Es otro método para evaluar la capacidad de flujo de los granulados. Está relacionado con la fricción interparticular o la resistencia al movimiento entre las partículas (Lieberman y Lachman, 1984; Iraizoz y col., 1992; USP, 2007).
Velocidad de flujo (Vf)	Es una medida de la facilidad de una masa de polvos para fluir a través de una tolva y depende tanto de factores del proceso de fabricación, como de algunas características de la partícula. Su control puede ser muy útil en el proceso de fabricación de tabletas (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col., 1992; Patel y col., 2007; Shekunov y col., 2007; USP, 2007).
Humedad residual (Hr)	Una adecuada humedad es importante para lograr una buena compactación de la tableta. Se recomienda entre 1 y 2% (Lieberman y Lachman, 1984). En productos naturales se obtienen valores superiores sin que se afecten los valores de fluidez y compresibilidad de los mismos (Sharapin, 2000). (Patel y col., 2007; Shekunov y col., 2007).
Tamaño y distribución del tamaño de partícula	Son propiedades de importancia trascendental en Tecnología Farmacéutica (Burgess y col., 2004; Patel y col., 2007; Shekunov y col., 2007). La distribución normal de tamaño de partícula permite un buen flujo, que a su vez permitirá un correcto llenado de la matriz de la máquina compresora, permitiendo que la masa de granulados se acomode mejor bajo presión y se logra una tableta más compacta y homogénea, dura y poco friable (Lieberman y Lachman, 1981, Iraizoz y col., 1992)

aspereza de la superficie y la homogeneidad del color son evaluadas por especialistas como medidas de calidad (Gibson, 2005).

Sabor. El sabor es determinante en la aceptación de la tableta, cuando ésta deba masticarse o disolverse en la boca, lo que pondrá al principio activo en un estrecho y prolongado contacto con las papilas gustativas. El sabor deberá enmascarse en caso de ser desagradable.

Uniformidad de masa

Una tableta es diseñada para contener una cantidad específica de principio activo disuelto (generalmente) en excipientes tecnológicos. Para chequear que la tableta posee la masa adecuada, esta es rutinariamente medida (Lieberman y Lachman, 1984; Iraizoz y col., 1992; Gibson 2005). La farmacopea estadounidense y la británica estipulan límites para la variación de la masa permisible de las tabletas. Para una tableta de masa promedio igual a 600 mg, ambas farmacopeas admiten una variabilidad de $\pm 5\%$ (USP, 2007, BP, 2010).

Uniformidad de contenido

Para asegurar la uniformidad del principio activo en las tabletas con bajas dosis es necesario aplicar el ensayo de uniformidad de contenido (Lieberman y Lachman, 1984; Iraizoz y col., 1992; Gibson, 2005). Este ensayo se realiza utilizando una técnica analítica específica para el principio activo, que deberá estar validada. Las tabletas no deben exceder la cantidad de $\pm 15\%$ del contenido de principio activo, y si alguna excede $\pm 25\%$ deberá rechazarse el lote. Los ensayos específicos para evaluar los lotes aparecen descritos en los compendios oficiales (USP, 2007; BP, 2010).

Cuando el principio activo de la tableta representa del 90 al 95 por ciento de la masa total de la tableta, el ensayo de uniformidad de masa servirá también como ensayo de uniformidad de contenido (Iraizoz y col., 1992; USP, 2007; BP, 2010).

Dureza

Las tabletas necesitan cierta dureza para soportar los procesos de envasado, manipulación, transportación etc. La resistencia a la fractura diametral es una medida de la dureza de las tabletas. La literatura plantea que un valor de 5 kg/fuerza o mayor

es el adecuado para las tabletas (Lieberman y Lachman, 1981), pero ello deberá valorarse en cada formulación, pues lo que puede considerarse adecuado para una formulación, pudiera no serlo para otra.

En el proceso de establecimiento de los parámetros de calidad de las tabletas se deberá prestar especial atención al balance dureza-friabilidad, buscando una óptima dureza, que produzca tabletas con adecuada friabilidad y que permita obtener tiempos de desintegración acordes a las normas internacionales.

Friabilidad

La friabilidad es una medida de la resistencia mecánica de las tabletas. Está relacionada con la capacidad de las mismas de perder partes debido a los golpes que se producen entre ellas en el proceso de envasado, transporte y el uso por los pacientes. Esto redundaría en una pérdida de la elegancia y apariencia de las mismas. Se consideran aceptables tabletas que no pierden más del 1% del peso en el ensayo de friabilidad (Lieberman y Lachman, 1984; Iraizoz y col., 1992, USP, 2007). Tabletillas muy secas generalmente son más friables (Lieberman y Lachman, 1984). Cuando las tabletas son demasiado blandas también aumenta la friabilidad.

Tiempo de desintegración

La desintegración de un comprimido resulta importante para lograr la disolución del principio activo facilitando su disponibilidad en el organismo. Un comprimido que no desintegre adecuadamente, limitará la disolución y absorción del fármaco y en consecuencia, la respuesta terapéutica no será la esperada. El tiempo de desintegración para comprimidos sin cubierta debe ser ≤ 15 min (BP, 2010).

Altura

Esta propiedad debe permanecer constante y no apartarse de $\pm 5\%$ de la altura estándar durante el proceso de elaboración de la tableta (USP, 2007; BP, 2010). Este parámetro es una medida de que el proceso de compresión se llevó a cabo eficientemente, sin que se altere la masa de la tableta o la presión de compresión; que son dos parámetros que pueden influir en la variación de la altura de la tableta. Una altura uniforme es importante para el envasado de las tabletas en blister (Lieberman y Lachman, 1984; Iraizoz y col., 1992).

En general, la preparación de tabletas es un proceso complejo que depende de muchos factores, y cuando se trata de tabletas cuyo principio activo es un extracto vegetal, el problema se multiplica, pues los polvos y granulados obtenidos a partir de estos extractos casi siempre fluyen y comprimen mal. Además, propiedades como olor, color y sabor de extractos naturales son características que obligan a los tecnólogos a trabajar con rigor, en cada una de las etapas del desarrollo de tabletas, desde la etapa de recolección y procesamiento del material vegetal, hasta los estudios de estabilidad.

1.7 Evaluación toxicológica de fármacos

Durante el desarrollo de medicamentos, especialmente durante el desarrollo de fármacos de origen natural, se hace necesario evaluar la potencialidad del mismo para causar toxicidad. Esta evaluación constituye un paso inicial imprescindible para el establecimiento de los regímenes de dosificación, de las formas farmacéuticas, y para una garantía de la seguridad en su uso.

Toxicidad aguda oral por el método de las clases de toxicidad

La evaluación de la toxicidad oral aguda de cualquier sustancia, constituye un paso inicial imprescindible para el establecimiento de los regímenes de dosificación, y constituye la base para su clasificación dentro de las clases de toxicidad (OECD 423, 2001). Existen varios métodos para evaluar la toxicidad aguda oral de las sustancias (OECD 425, 2008), pero el más utilizado en la literatura, es el Método de las Clases de Toxicidad (CTA) (Romero y col., 2002; Jiménez y col., 2006; Díaz y col., 2008; Aboudoulatif y col., 2010). En este método se administra por vía oral a los biomodelos determinada cantidad de la sustancia a evaluar y en función de las observaciones realizadas y teniendo en cuenta la dosis utilizada, se clasifican las sustancias en diferentes grados o clases de toxicidad (OECD 423, 2001).

En la evaluación de la toxicidad aguda oral de una sustancia se buscan manifestaciones clínicas que evidencien daños asociados a lesiones en órganos y sistemas de órganos, que traen por resultado alteraciones en sus funciones (Hayes, 1994). Se plantea que toda sustancia tóxica produce alteraciones anatomofisiológicas que se manifiestan en modificaciones en el cuadro clínico

general, y estas dependen de la severidad y extensión de la lesión, así como de los sistemas de órganos involucrados, la duración de la exposición, la cantidad total de la sustancia en sangre, la edad y el estado de salud general del animal (Hayes, 1994; OECD 423, 2001).

En estos ensayos se evalúan además, signos como cambios en el pelaje y la piel, la coloración y apariencia de los ojos y de las membranas mucosas, así como del sistema respiratorio, circulatorio y nervioso en los biomodelos. Se observa además la actividad somato motora y el comportamiento del animal (Hayes, 1994; OECD 423, 2001).

Se deberá prestar atención al peso corporal de los biomodelos (Gad, 1994), parámetro más sensible para indicar un efecto tóxico y detectar alteraciones debidas a productos químicos de baja toxicidad (Mosberg, 1989). El peso corporal es el indicador que ofrece mayor información en los estudios toxicológicos, y se refiere que en presencia de tóxicos se produce una perdida acelerada del mismo de aproximadamente un 15 a 29 % en un período de cinco a siete días (*Harvard Medical Asea*, 1999).

En este estudio los animales se someten a necropsia macroscópica, para registrar cambios patológicos y se puede realizar examen microscópico en aquellos órganos que presenten evidencias de patologías macroscópicas.

Estudios de irritabilidad

Los estudios de irritabilidad son un paso importante a considerar en la evaluación de la seguridad de sustancias que se van a poner en contacto con la piel o las mucosas. El ensayo de irritación oral debe considerarse solamente para los materiales con contacto previsto con el tejido bucal y sólo si los datos de seguridad no pueden obtenerse por ningún otro medio (ISO/DIS 10993/10; 1992).

El principio del estudio es hacer una evaluación del potencial irritante de una sustancia para producir la irritación del tejido oral. Cualquier material que haya demostrado ser un irritante dérmico u ocular o aquel cuyo pH sea menor que dos o mayor que 11.5 no debe someterse a este ensayo y debe identificarse como un irritante potencial del tejido oral (ISO/DIS 10993-10, 1992).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Selección del material vegetal

Las hojas fueron colectadas en el horario de la mañana, de plantas adultas, de una población de *Tamarindus indica* L. localizada en El Caney, Santiago de Cuba (Ubicación: 20° 2'38.9'' N y 075° 45'25.8'' W), un sitio alejado de carreteras. La población fue identificada taxonómicamente por el Dr. Jorge Sierra Calzado, depositándose una muestra de la especie en el Herbario del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, con el número de registro 052216.

El material se seco al sol hasta peso constante (humedad residual en estufa de 8 a 12 %), se molinó (Molino de cuchillas Man, México) y tamizó (MLK, Rusia) hasta un tamaño de partículas aproximado de cinco milímetros, el cual fue previamente optimizado para su selección.

II.2 Obtención y estandarización del extracto blando

II.2.1. Método de preparación

Para la obtención del extracto blando de *Tamarindus indica* L (EBT), se procedió primeramente a la preparación del extracto fluido de las hojas por el método de percolación, empleando etanol al 72% como menstruo, un tiempo de humectación de 90 minutos. El tiempo de percolación fue de 48 horas, según la metodología establecida por Escalona y colaboradores (Escalona y col., 2011^b).

El EBT se obtuvo por el método de concentración a vacío del extracto fluido, en un rotoevaporador (IKA WERKE GMBH & Co., Alemania) con capacidad de 1000 ml. Se colocaron 500 ml del extracto fluido, se ajustó el baño de agua del equipo a $42 \pm 2^{\circ}\text{C}$, y se aplicó un vacío de aproximadamente -101 kPa. Se concentró el extracto hasta aproximadamente un cuarto del volumen inicial. Los extractos así obtenidos, fueron unidos, medidos y concentrados hasta lograr una proporción de un mililitro de extracto, por cada cuatro gramos de droga seca, según lo establece la Norma Ramal de Salud Pública 311 del 1991 (NRSP 311, 1991).

II.2.2 Determinación de la huella espectral UV.

En un espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III; Suecia) se registró el espectro de absorción en la región entre 200 y 400 nm, de una solución de 0.5 g de extracto blando en 500 ml de una solución hidroalcohólica al 72%. Se utilizó para la obtención de la línea base la solución hidroalcohólica al 72%.

II.2.3 Evaluación de las propiedades físicas y fisicoquímicas

Se evaluaron las propiedades organolépticas, densidad relativa, sólidos totales, pH y cenizas totales, establecidas en la norma cubana vigente, Norma Ramal de Salud Pública 312 del 1991 (NRSP 312, 1991).

II.2.4 Determinación de polifenoles y flavonoides

La cuantificación de polifenoles se realizó por el método de Folin Ciocalteu (USP, 2007), previamente validado. La determinación de flavonoides se realizó por el método del cloruro de aluminio descrito en la Farmacopea Británica (BP, 2010).

II.2.5 Análisis de elementos minerales por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP)

El análisis en este estudio se consideraron aquellos elementos de valencia múltiple que por sus posibles cambios de estados de oxidación pueden jugar un papel importante en el balance redox de la célula, como hierro, molibdeno, cobalto, níquel, manganeso, cromo y vanadio. Se incluyeron además, elementos que forman parte de enzimas antioxidantes importantes como el cobre, cinc y selenio, y otros que por su toxicidad deben ser monitoreados como el plomo y el cadmio. El análisis se realizó por (ICP), en un equipo de vista axial (SPECRO ARCOS, Alemania). Todos los reactivos empleados fueron de la marca Merck, con calidad espectral.

En un volumétrico de 500 ml se adicionó 1.0 g de EBT, 10 ml de agua destilada y 10 ml de ácido nítrico concentrado (Merck, Alemania, calidad espectral). Se agitó vigorosamente por 5 min. y se diluyó y enrasó con agua destilada. De este volumétrico se tomaron 3 ml y se llevaron a un volumétrico de 25 ml y se enrasó con agua desionizada, con una conductividad menor de 0.1 $\mu\Omega/\text{cm}$.

Las condiciones de experimentación se refieren a continuación:

Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Frecuencia	27 MHz	Tipo de nebulizador	Meinhard (concéntrico)
Energía del plasma	1.4 KW	Tipo de antorcha	De una sola pieza
Tiempo de integración	24 segundos	V. Flujo del gas portador	0.4-1.5 l/ min (optimizada)
Corrección del fondo	dinámica	V. Flujo del gas auxiliar	1 l/min.
Preflujo lento	2,28 rpm (3rpm)	V. Flujo del gas	12 l/min.
# de mediciones	3	Preflujo rápido	4,20ml/min. (63 rpm)
Ranura de entrada	25 µm	Distancia de observación	3-10 mm (optimizada)
Dispersión	0.55 mm/min.	Resolución del monocromador	0.0137 mm
Factor de tiempo	100 %	Distancia focal del espectro	750 mm

II.2.6 Establecimiento de los indicadores de calidad del extracto blando

Para el establecimiento de los parámetros de calidad, se prepararon 10 lotes de EBT de un litro cada uno (1.3 kg aproximadamente). Se realizó la preparación con droga representativa de todos los estados fenológicos de la planta (recolectada y procesada a lo largo de un año). Se utilizó la metodología 3σ para el establecimiento de los límites de calidad de los parámetros cuantitativos (OMS, 2005), realizando 5 réplicas por lote. Se calculó en cada caso la media y la desviación estándar (DE). Los límites máximo y mínimo se establecieron por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Mínimo} = \text{Media} - 3\text{DE} \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$\text{Máximo} = \text{Media} + 3\text{DE} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Se realizó un análisis unidimensional a la data de los 10 lotes utilizados para cada parámetro evaluado, empleando para ello el software StatGraphics 5.0.1 (StatEase Co. Minneapolis, USA). Se realizó un análisis de varianza (Anova) para evaluar posibles diferencias significativas entre los lotes y una prueba de Rangos Múltiples de Duncan para conocer los lotes con medias diferentes. Se evaluó para cada parámetro, la normalidad de la data utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov (Mongomery, 2000). Se utilizó un intervalo de confianza de 95 %.

II.3 Desarrollo de la formulación de tabletas de tamarindo

II.3.1 Etapa de preformulación

II.3.1.1 Selección de los excipientes

Se seleccionaron 6 excipientes de los más utilizados en la literatura (Rowe, 2009, Lira y col, 2005^a) para la preparación de formas farmacéuticas sólidas con extractos vegetales:

- Celulosa microcristalina: **(MCC)** (Microcell 101 USP 28 Blanver, Brasil): se utiliza como relleno y resulta útil, además, por sus propiedades desintegrantes.
- Lactosa monohidratada: **(LM)** (Contero Excipientes, Nueva Zelanda): se emplea como relleno, éste es posiblemente el excipiente que más se utiliza en la preparación de formas farmacéuticas sólidas con productos naturales.
- Polivinilpirrolidona: **(PVP)** (Kolidón 25, Basf Alemania), se utiliza como aglutinante
- Dióxido de silicio coloidal: **(Ae)** (Aerosil ® V-200 Degusa Bélgica): se utiliza como agente mejorador de flujo de los granulados y tiene especial función como agente absorbente de humedad
- Croscarmelosa sódica: **(CCS)** (AcDiSol Blanver Brasil): se utiliza como agente desintegrante en la formulación.
- Estearato de magnesio: **(EM)** (Derive SA Alemania): se utiliza como agente lubricante del granulado durante el proceso de compresión.

II.3.1.2 Estudio de compatibilidad extracto blando-excipientes

Para estudiar la compatibilidad del EBT con los excipientes seleccionados para la formulación, se prepararon mezclas binarias (Gibson, 2005; Adeyeye y Brittain; 2008) del EBT con cada uno de los excipientes, en una relación de 1:3. Se mezclaron en un mortero pequeño y se pasaron por una malla de 250 µm, de modo que quedara la mezcla bien distribuida sobre la superficie de una placa de Petri para facilitar su secado. Se secaron en estufa de vacío (MLW, Alemania) a una temperatura de 40°C, durante cinco horas, hasta una humedad residual de 3%. Las mezclas secas se pasaron por una malla de 250 µm para homogeneizar el tamaño de partícula. Se tomó 15.0 g de cada una y se envasaron en frascos de color ámbar con tapa esmerilada.

Las mezclas se mantuvieron a 30, 45 y 60°C durante 30 días, utilizando para ello una estufa de vacío (MLW, Alemania).

Se evaluaron diferencias en el color y el olor, utilizando los órganos sensoriales. Se determinó la cantidad de polifenoles en el EBT tratado individualmente a las mismas temperaturas, y en cada una de las mezclas utilizando el método de Folin Ciocalteu (BP, 2010) a tiempo 0, 7, 15, 21 y 30 días de tratamiento.

II.3.1.3 Estudio de posibles interferencias de los excipientes en el método de determinación de polifenoles

Por ser componentes mayoritarios de los extractos de *Tamarindus indica* L, el grupo de metabolitos seleccionado para el control de la calidad química del EBT y de las mezclas binarias en este estudio fueron los polifenoles.

Para evaluar si alguno de los excipientes en las mezclas binarias, podía interferir en la determinación de los polifenoles, utilizando el método de Folin Ciocalteu, se aplicó este método a cada uno de los excipientes por separado, y a una mezcla de todos los excipientes con y sin adición del EBT.

Para ello, se colocaron en una zaranda por 24 horas, frascos erlenmeyer que contenían 250 ml de agua destilada y 0.1 g de cada uno de los excipientes. Al cabo de este tiempo se filtraron por papel e filtro y se desecharon los primeros 25 ml.

De los filtrados se tomaron 3 ml, y se llevaron a frascos volumétricos de 25 ml a los que se les añadió 1 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y 2 ml de una solución de carbonato de sodio al 20%. Se agitó circularmente, se dejó reposar 5 min y se completó el volumen con agua destilada. Adicionalmente, se prepararon dos volumétricos de 25 ml a los que se les añadió 1ml de cada filtrado de la solución de excipientes. A uno de ellos se le añadió 1 ml de la solución reactivo de Folin Ciocalteu y 2 ml de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó y se enrasó a 25 ml, al otro se le añadieron 3 ml de solución de extracto blando de tamarindo, 1 ml de la solución reactivo de Folin Ciocalteu y 2 ml de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó y se enrasó a 25 ml con agua destilada. Se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 700 nm, en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III; Suecia).

Se evaluó la linealidad y la selectividad de la respuesta del método (absorbancia a 700 nm), con relación a la adición sucesiva de volúmenes de EBT. Para ello, se adicionaron a seis volumétricos de 25 ml, 5 ml de la mezcla de todos los excipientes y a continuación, se adicionaron alícuotas crecientes del EBT comenzando por 0 (1 ml de agua destilada) y desde 1 ml hasta 5 ml al resto de los frascos. Se les añadió a todos 1 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y 2 ml de una solución de carbonato de sodio al 20%. Se agitó circular y suavemente. Se dejó reposar 5 min y se completó el volumen con agua destilada. Se midió la absorbancia de cada una a 700 nm.

Se realizó la correlación entre la absorbancia y el volumen añadido. Se tomó como referencia que el coeficiente de determinación (R^2) de la recta fuera mayor que 0.99, y que el intervalo de confianza del intercepto incluyera el valor 0 (Eurachem, 2006).

Los frascos se observaron durante 24 horas. Cualquier coloración azul o azul verdosa que apareciera sería considerada como una respuesta positiva a la oxidación producida por el reactivo de Folin Ciocalteu, y por tanto, el excipiente o la mezcla de excipientes interferirían en la determinación, tanto en la mezcla binaria como en la forma terminada que contenga estos excipientes (Castiñeira, 1986, Adeyeye and Brittain; 2008)

II.3.1.4 Evaluación del efecto de la temperatura. Análisis térmico

Como se observó un marcado efecto de la temperatura en la concentración de polifenoles en las mezclas binarias y en el EBT tratado individualmente, se realizó un Análisis Térmico, para evaluar el comportamiento de este extracto una vez seco, cuando se somete a calentamiento constante.

Previamente, se liofilizó el extracto fluido, en una liofilizadora (Virtis Advantage, USA) utilizando una bomba de vacío Trivac CE (Leybold Vakuum, Köln, Alemania), con un condensador Flexi Dry (FTS Kinetics, Stone Ridge, NY). Se utilizaron viales de 10ml con 5 ml de extracto fluido de tamarindo. El vacío aplicado fue de -100 um de Hg. En la primera etapa se congeló a -40°C, a una velocidad de 1°C /min durante 90 min. En la segunda etapa se aplicó el vacío y se mantuvo la temperatura a -40°C por 20 h, se aumentó la temperatura a -30°C y se mantuvo a esta temperatura por 20 h más.

Luego se elevó la temperatura gradualmente hasta 0°C. En la tercera etapa, se aumentó la temperatura a 25°C y se mantuvo en estas condiciones 5 h.

Se realizó análisis Termogravimétrico (TG) y Análisis Térmico Diferencial (ATD), en el intervalo de temperaturas de 0°C a 100°C. Ambas técnicas se realizaron en un analizador termogravimétrico (Q50, TA Instruments, New Castle, USA). Se utilizó una velocidad de calentamiento de 5°C/min., calentando una masa de 417.3 mg de extracto seco en una cápsula abierta, bajo purga de nitrógeno.

II.3.1.5 Cromatografía en capa delgada

Se realizaron ensayos por cromatografía de capa delgada (CCD) al EBT tratado a las temperaturas de 30°C, 45°C y 60°C durante 30 días. Para ello se utilizaron placas de Sílica gel GF₂₅₄ de tamaño 5x20cm, con indicador UV (Merck, Alemania), utilizando como fase móvil el n-butanol-ácido acético-2-propanol (4:2:4). Este sistema de solventes permitió la mejor separación de los componentes del extracto. El EBT se diluyó en proporción 0,5:100 ml en metanol y se puntearon 10 ul en la placa cromatográfica. Se secó al aire y se desarrolló el cromatograma durante 2.5 horas. Las placas se secaron en campana de extracción, se revelaron con luz ultravioleta a 254 nm, y se marcaron las manchas producidas en cada caso. Se compararon los R_f de las manchas aparecidas en los cromatogramas a cada valor de temperatura, para evaluar posibles diferencias entre los mismos.

II.3.1.6 Selección de la cantidad de principio activo a utilizar en la formulación

Para la selección de la cantidad de EBT como principio activo de las tabletas de ***Tamarindus indica* L**, se tomó como criterio la utilización etnobotánica de las hojas de la planta. En este sentido a través de encuestas realizadas por el proyecto Farmacia y Comunidad del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente, se conoció que los pacientes con problemas hepáticos, específicamente en el período de reposo durante las hepatitis, ingieren diariamente entre 3 y 4L de decocción de las hojas de ***Tamarindus indica* L**. Esto es lo que el uso etnobotánico refiere “consumir como agua común”.

Para este trabajo se prepararon las decocciones y se evaluó la cantidad de sólidos totales, resultando entre 3 y 5%. Con esta información se calculó que 4 L de

decocción con una concentración promedio de sólidos totales de 4%, equivalen a 160 mg que es lo que consumen los pacientes en un día.

La cantidad de 120 mg en la tableta obedece a razones tecnológicas. Se llegó a una formulación adecuada, con la cantidad de EBT equivalente a 120 mg, lo que representa para un paciente que consuma dos tabletas, la cantidad equivalente a 6 L de decocción. Se eliminan así los inconvenientes del gran volumen de administración, mejorando además la seguridad y la estabilidad que presenta la decocción como preparado farmacéutico.

II.3.1.7 Evaluación preliminar de formulaciones de tabletas de *Tamarindus indica* L.

Se diseñaron tres formulaciones preliminares en las que se utilizaron diferentes combinaciones de los excipientes seleccionados. La tabla V muestra las cantidades de excipientes utilizadas en cada formulación. Las tabletas se elaboraron siguiendo el método de granulación húmeda a escala de laboratorio (Iraizoz y col, 1992), mezclando primero el EBT con los polvos y luego con la solución aglutinante (Figura 2). Los granulados se secaron a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, en una estufa de vacío (MLW, Alemania). Se evaluó la calidad de los mismos utilizando las propiedades densidad de vertido y asentamiento, velocidad de flujo y ángulo de reposo (Iraizoz y col, 1992, Lachman y Lieberman, 1987). Se calcularon los índices de Hausner y compresibilidad (BP, 2010; USP, 2007) y se evaluó la normalidad del tamaño de partícula utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, con un nivel de significación de 0.05 (Mongomery, 1984).

Se comprimieron las tabletas a 80 MPa, en una máquina excéntrica (Manesty, UK) utilizando punzones planos, biselados de 12.7 mm de diámetro, para obtener una tableta de 600 mg. Se evaluó la uniformidad de masa, altura, dureza y el tiempo de desintegración según las farmacopeas (BP, 2010; USP, 2007) y la cantidad de polifenoles en las tabletas utilizando el método de Folin Ciocalteu (BP, 2010).

II.3.2 Etapa de formulación y optimización de las tabletas

II.3.2.1 Diseño de experimento

Para realizar el estudio de formulación y optimización de las tabletas de *Tamarindus*

Tabla V. Formulaciones preliminares diseñadas en la etapa de preformulación

Excipientes	UM	1	2	3
Celulosa microcristalina	%	32.5	31.5	30.5
Lactosa monohidratada	%	37.0	38	39
Dióxido de silicio coloidal (Aerosil [®])	%	0.5	1.0	1.5
Croscarmelosa sódica	%	4.5	4.0	3.5
Polivinilpirrolidona	%	4.0	4.0	4.0
Estearato de magnesio	%	1.5	1.5	1.5
Extracto blando de <i>T. indica</i> L (como sólidos totales)	%	20.0	20.0	20.0
Total	%	100.0	100.0	100.0

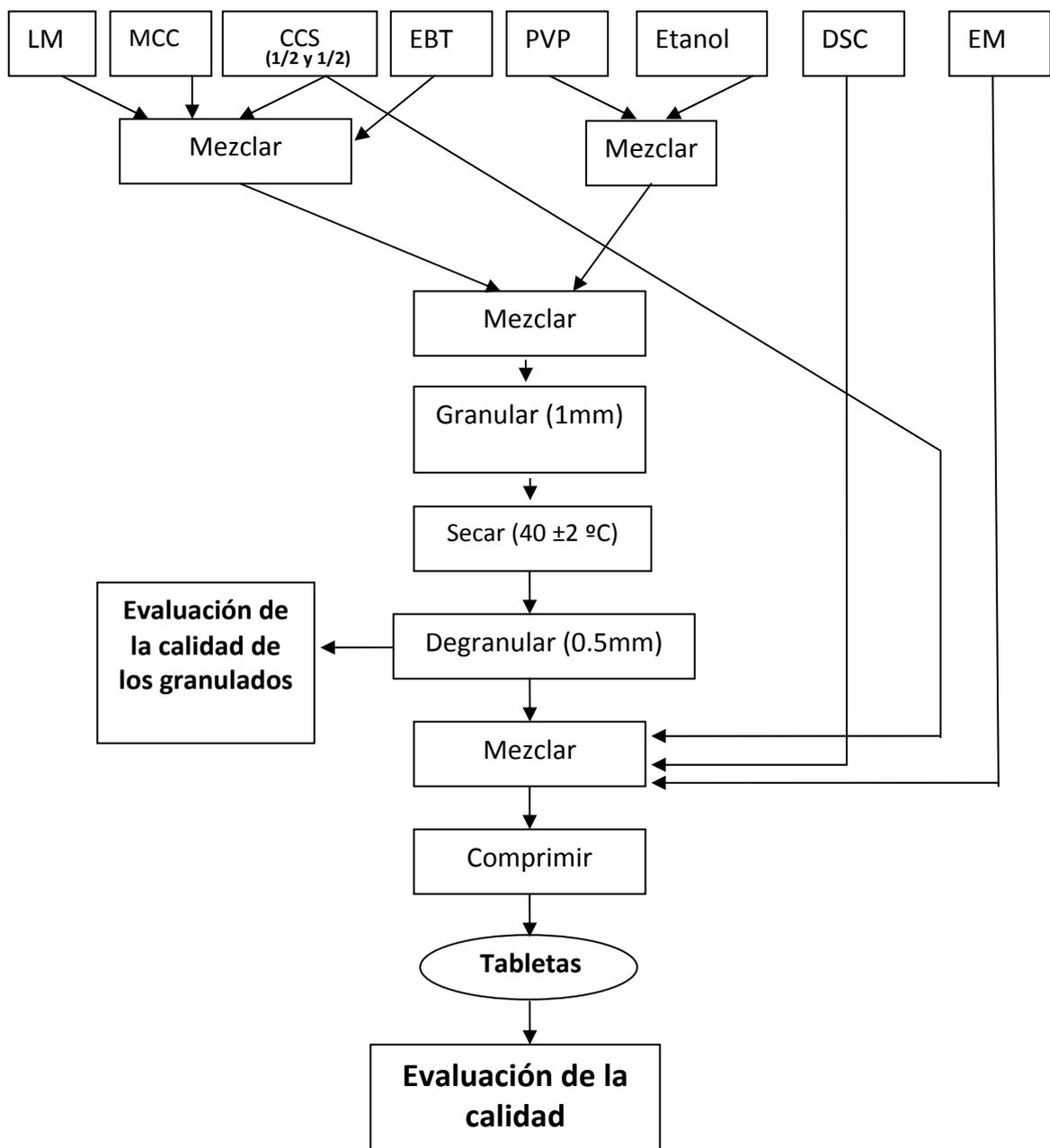


Figura 2. Proceso tecnológico de preparación de los granulados y tabletas de tamarindo.

LM, lactosa monohidratada, MCC celulosa microcristalina, DSC dióxido de silicio coloidal, CCS croscarmelosa sódica, PVP polivinilpirrolidona, EtOH etanol, y EM estearato de magnesio.

indica L se seleccionaron los excipientes celulosa microcristalina, lactosa monohidratada y polivinilpirrolidona. Para el resto de los ingredientes, las cantidades añadidas se mantuvieron constantes en la fórmula. Se prepararon 400g de granulados en cada una de las corridas realizadas. La selección de las cantidades de excipientes a utilizar en la formulación se realizó de acuerdo con un diseño de mezcla D-optimal (Ericsson y col., 1998). Las cantidades de cada excipiente utilizadas en el diseño se muestran en la tabla VI.

En la tabla VII se presenta la matriz experimental del diseño de mezcla D-optimal obtenida con el software *Design Expert 6.0.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA)*. Las variables respuestas seleccionadas fueron: índice de Hausner, índice de compresibilidad, velocidad de flujo, ángulo de reposo y humedad residual. Se verificó en cada caso la normalidad de los datos aplicando la prueba de *Kolmogorov – Smirnov (StatGraphics 5.1. StatEase Co. MA. USA)*.

II.3.2.2 Método de preparación de los granulados y tabletas

En la figura 2 se presenta el diagrama de flujo del método de granulación húmeda utilizado. Se tamizaron todos los polvos por una malla de 250 μm antes de mezclarlos. Esta operación se realizó en una mezcladora horizontal de laboratorio, provista de tornillo sinfín (Eureka AR-400, USA). La masa húmeda se pasó por una malla de 500 μm y posteriormente se secó en una estufa de vacío (Sartorius, Alemania) durante tres horas a 40°C. Se comprimieron las tabletas en una máquina compresora excéntrica (MANESTY, UK), utilizando punzones planos biselados de 12,7 mm y una presión de 80 kPa. Se obtuvieron tabletas de 600 mg de masa promedio, con un 20% de sólidos del EBT y 3,45% de polifenoles como valores nominales. Una vez obtenidas las tabletas, se envasaron en frascos de PVC de alta densidad con tapa inviolable y se almacenaron en lugar seco y fresco (Temperatura promedio 25°C y humedad relativa 40-50%).

II.3.2.3 Evaluación de la calidad de los granulados

II.3.2.3.1 Evaluación del tamaño medio de partícula

Se realizó por el método de los tamices (Lieberman y Lachman, 1984), utilizando

Tabla VI. Proporciones de los excipientes de la formulación, empleados en el diseño de experimento para el proceso de formulación y optimización de las tabletas de tamarindo.

Excipientes	Cantidad (%)
Celulosa microcristalina	30 – 31
Lactosa monohidratada	37 – 39
Polivinilpirrolidona	4,5 – 6,5
Subtotal	74,5
Croscarmelosa sódica	3,5
Dióxido de silicio coloidal	1,0
Estearato de magnesio	1,0
Extracto blando (sólidos totales)	20,0
Total	100

Tabla VII. Matriz del diseño de mezcla D-optimal, donde se muestran los porcentajes de cada uno de los excipientes utilizados en las corridas experimentales en el proceso de formulación.

No	LM (%)	MCC (%)	PVP (%)
1	38,00	31,00	5,50
2	38,00	30,00	6,50
3	38,38	30,25	5,88
4	38,00	30,00	6,50
5	37,00	31,00	6,50
6	39,00	30,00	5,50
7	39,00	31,00	4,50
8	37,50	30,50	6,50
9	39,00	30,50	5,00
10	37,00	31,00	6,50
11	37,63	30,75	6,13
12	38,00	31,00	5,50
13	39,00	31,00	4,50
14	38,63	30,50	5,38

LM lactosa monohidratada; MCC celulosa microcristalina;

PVP polivinilpirrolidona

tamices de 800, 500, 400, 325, 200, 100 y 50 μm de luz de malla. Se utilizó para las pesadas una balanza digital (Sartorius TE 3102s, Alemania) con una precisión de 10^{-2} g. Se tamizó en una tamizadora (THYL-1, Rusia), colocando el equipo en la posición 7 de la escala vibratoria durante 15 min. El tamaño de partícula se determinó utilizando la expresión:

$$\bar{X} = \frac{\sum (n_i X_i)}{N} \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde: X = tamaño medio de partícula del granulado, n_i = masa de partículas en cada tamiz, X_i = tamaño de partícula medio, tomado como la media aritmética entre dos tamices consecutivos y N = masa total tamizada. Se garantizó que nunca quedara granulado en el tamiz superior.

II.3.2.3.2 Índices de Hausner y de compresibilidad

Las densidades de vertido (D_v) y compactada (D_a) se determinaron por el método de las probetas (USP, 2007; BP, 2010). Para densidad de asentamiento, se realizó un perfil de compactación, estableciéndose en 750 el número de golpes. El índice de Hausner (RH) se calculó utilizando la ecuación 4 y el índice de compresibilidad (IC) se calculó utilizando la ecuación 5 (USP, 2007; BP, 2010).

$$RH = D_a / D_v \quad \text{Ecuación (4)}$$

$$\%C = (D_a - D_v) * 100 / D_a \quad \text{Ecuación (5)}$$

II.3.2.3.3 Determinación de la velocidad de flujo

La velocidad de flujo (V_f) se determinó haciendo pasar una masa de granulado (m) previamente pesada (10 g) a través de un embudo de 120 mm de diámetro en su parte superior, con paredes de 45° y vástago corto de diámetro (d) igual a 0,8 cm (Iraizoz y col., 1992). Se midió con un cronómetro el tiempo (t) que tardó en fluir la masa de polvo a través del orificio del embudo. La velocidad de flujo se calculó utilizando la ecuación 6. La literatura establece como buenos, valores de velocidad de flujo superiores $7 \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$.

$$V_f = \frac{m \text{ (g)}}{0.785 * d^2 * t} \quad \text{Ecuación (6)}$$

II.3.2.3.4 Determinación del ángulo de reposo

Se determinó por el método del embudo, dejando caer libremente una masa de granulada desde una altura de 8 cm, y midiendo la altura y el radio de la masa de polvo depositada. El ángulo de reposo se calculó como el arco tangente de la altura de la masa de polvo (H) sobre el radio de la misma en el plano (R). Se consideran buenos valores de ángulo de reposo, aquellos que están por debajo de 30° (Iraizoz y col., 1992, USP, 2007).

$$\arctang \alpha = \frac{H}{R} \quad \text{Ecuación (7)}$$

II.3.2.3.5 Humedad residual

Se determinó la humedad residual de los granulados por el método gravimétrico, utilizando para ello una balanza gravimétrica (Sartorius modelo SA 325, Alemania) (USP, 2007). La humedad residual de los granulados no debe resultar superior de 2% (Lieberman y Lachman, 1984).

II.3.2.4 Evaluación de la calidad de las tabletas

II.3.2.4.1 Características organolépticas

Se evaluó el tono y uniformidad de color y la apariencia de las tabletas por simple inspección visual.

II.3.2.4.2 Uniformidad de masa

Se pesaron en una balanza (Sartorius, Alemania) 20 tabletas de forma individual y se determinó la variación en por ciento con relación a la masa nominal del comprimido (600 mg). Las tabletas individuales no debían apartarse más de un 5 % del peso nominal de los comprimidos (600 ± 30 mg) (USP, 2007).

II.3.2.4.3 Altura de la tableta

Se tomaron 10 tabletas y se determinó la altura de las mismas con un micrómetro (MK

0-25, Rusia), la altura de las tabletas se promedió y se informó la media \pm la desviación estándar. La altura de las tabletas no debe apartarse más de un 5% de su altura nominal (Iraizoz y col., 1992)

II.3.2.4.4 Dureza

Se determinó la resistencia a la compresión diametral, utilizando un durómetro manual (Monsanto, USA). Se tomaron 10 tabletas y se determinó la dureza a cada una de ellas. Se informó la media y la desviación estándar (Lieberman y Lachman, 1987, Iraizoz y col., 1992).

II.3.2.4.5 Friabilidad

Se realizó por el método clásico reportado en la literatura (Iraizoz y col., 1992) utilizando un friabilómetro (Roche, Suiza). Se informó el por ciento de friabilidad (Fr) y la desviación estándar correspondiente.

II.3.2.4.6 Tiempo de desintegración

Se realizó el ensayo por el método descrito en la farmacopea estadounidense (USP, 2007). Se utilizó para ello como medio de desintegración 900 ml de agua destilada a 37°C, en un equipo desintegrador (Erweka TM 600, Offenbach, Alemania). Se informó la media \pm la desviación estándar de 6 determinaciones.

II.3.2.4.7 Uniformidad de contenido

Se realiza según la USP (2007). Se analizaron 10 tabletas de tamarindo individualmente, determinándose el contenido de polifenoles en cada una de ellas, por el método de Folin Ciocalteu (BP, 2010), previamente validado para esta finalidad.

II.3.3 Estudio de la estabilidad en estante

Para el estudio de estabilidad de las tabletas de *Tamarindus indica* L se elaboraron tres lotes a escala de laboratorio (de tamaño 0,6 kg), utilizando la formulación seleccionada, y se envasaron en frasco de PVC de alta densidad con tapa inviolable, escogido por los resultados de estudios acelerados de estabilidad. Se almacenaron a

temperaturas entre 25 - 30°C, con una humedad relativa promedio de 50-60% durante 24 meses.

II.3.3.1 Estabilidad física y química

Se comprobó cada tres meses, el comportamiento de todas las variables estudiadas durante la evaluación de la calidad tecnológica de las tabletas, declaradas en el acápite II.3.2.4.

II.3.3.2 Estabilidad química por Cromatografía de Capa Delgada

Con esta misma frecuencia de ensayo, se tomaron muestras para un estudio por Cromatografía de Capa Delgada. Para ello se utilizaron placas de Sílica gel GF₂₅₄ de tamaño 5x20 cm, con indicador UV (Merck, Alemania). Se empleó como fase móvil n-butanol: ácido acético: 2-propanol (P.A.; UNI-Chem, China) en la proporción (4:2:4) (v/v/v)

Cinco tabletas se trituraron en un mortero y el polvo resultante se trasvasó a un frasco erlenmeyer de color ámbar de 50 ml, con tapa esmerilada y se le añadieron 25 ml de solución hidroalcohólica al 72%. Se agitó en zaranda por 24 h, se filtró por papel y se aplicaron 7 µl de este extracto en la placa. Se desarrolló el cromatograma durante 2.5 h. Una vez secadas las placas en campana de extracción, fueron reveladas con luz ultravioleta a 254 nm, marcando las manchas observadas.

Se evaluó por comparación con el cromatograma a tiempo 0, si aparecían evidencias de degradación del principio activo en las condiciones de almacenamiento y conservación declaradas. Este estudio fue realizado hasta 9 meses (tiempo que se reporta este informe). Este ensayo continúa para establecer la fecha de caducidad de las tabletas.

II.3.3.3 Estudio de estabilidad microbiológica

Se evaluó la estabilidad microbiológica de las tabletas de tamarindo, por el método propuesto en la farmacopea británica (BP, 2010), durante un período de dos años. Los análisis se realizaron anualmente. Se consideraron los límites microbiológicos establecidos por la propia Farmacopea Británica.

II.4 Evaluación fármaco toxicológica de las tabletas de *Tamarindus indica* L

II.4.1 Biomodelos experimentales y consideraciones éticas

Toxicidad Aguda Oral

Para la evaluación de la Toxicidad Aguda Oral (OECD 423, 2001) se utilizaron seis ratas Sprague Dawley, tres de cada sexo, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana). El peso corporal de todos los biomodelos experimentales estuvo comprendido entre 150 y 200 g. El estado sanitario se correspondió con animales sanos, de acuerdo con el certificado de salud y los estudios confirmatorios realizados en el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) perteneciente a la Universidad Médica de Santiago de Cuba. Los animales se sometieron a cuarentena en el vivario de este centro durante 7 días, mantenidas en cajas Makrolon modelo 1000, a razón de 3 animales por caja, con un lecho de virutas de madera no oleosa, cernida y esterilizada (PNT 422005, 2007). Las condiciones ambientales fueron: temperatura entre 21-25°C, humedad relativa 30–70 %, ciclo luz/oscuridad 12/12 horas. La alimentación se realizó *ad-libitum*, con pienso convencional multipropósito (CMO-1000), no esterilizable.

Irritabilidad de la mucosa oral

Para la evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral se utilizaron 6 animales, hembras, de una cepa no consanguínea, de la especie Hámster Sirio Dorado (ISO 10993-10, 2001), de peso corporal entre 50–60 g, procedentes de CENPALAB, La Habana. El estado sanitario de los animales se correspondió con animales sanos, de acuerdo con el certificado de salud y los estudios confirmatorios realizados en TOXIMED.

La metodología y el diseño experimental en la evaluación de la toxicidad aguda oral, así como para la evaluación de la irritabilidad de la mucosa bucal, se realizan de acuerdo con las *Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)*, según lo establecido en las *Guías para el Manejo de Animales de Laboratorio y el International Council for Laboratory Animal Science* y se llevan a cabo según lo previsto en el Procedimiento Normalizado de Trabajo de TOXIMED (PNT 422031, 2007), de la Universidad

Médica de Santiago de Cuba, y según lo dispuesto por el Comité de Ética de este centro.

Actividad antioxidante y hepatoprotectora

Para la evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de las tabletas de ***Tamarindus indica* L**, se utilizaron ratas *Sprague Dawley*, hembras, totalmente sanas, de peso corporal entre 175 y 200 g, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, CEMPALAB, Ciudad de la Habana, Cuba. El estado sanitario de los animales se garantizó, de acuerdo con el Certificado Sanitario y los estudios confirmatorios realizados a los mismos.

Los animales se mantuvieron en cuarentena durante 7 días previos al estudio, a la temperatura 22 ± 2 °C, una humedad relativa 50–55 %, con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, alimentadas con pienso estándar y agua estéril *ad-libitum*. Se les retiró el alimento 18 horas antes de la primera administración.

Se utilizaron para este estudio ratas de la línea Sprague Dawley por ser uno de los biomodelos experimentales más empleados internacionalmente para la evaluación fármaco toxicológica de sustancias, dada la similitud de su metabolismo con el del ser humano, por su docilidad, por la estabilidad en su comportamiento y por su condición de animal no consanguíneo, representativo de la heterogeneidad de la población humana.

Durante todas las fases del estudio se consideraron las normas éticas descritas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (GCUAL), propuesta por *Natural Research Council Institute of Laboratory Animal Resources* (GCUAL; 2002).

II.4.2 Estudio toxicológico de las tabletas de *Tamarindus indica* L

II.4.2.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral

Se evaluó según la metodología propuesta en la norma OECD 423 del 2001. Se utilizó el método de las Clases de Toxicidad Aguda (CTA). Se emplearon un grupo control y un grupo experimental, compuesto de 3 animales cada uno. Al grupo experimental se le administró la dosis límite de 2000 mg/kg de peso corporal de polvo de las tabletas de ***Tamarindus indica* L**, suspendido en 1 ml de carboximetilcelulosa (Blanver, Brasil) al 0.5 % en agua, por cada 100 g de peso

corporal del animal. Al grupo control solo se le administró este vehículo en igual dosificación.

Se observó diariamente para registrar cualquier variación en el comportamiento o signo de toxicidad, como son los cambios en la piel y pelaje, coloración y apariencia de las membranas mucosas, ojos y nariz, así como la posible ocurrencia de muertes y tiempo de ocurrencia de las mismas.

Concluidas las observaciones clínicas, a los 14 días, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó el estudio anatomopatológico macroscópico de todos los órganos y especialmente del hígado, por ser el órgano diana de la formulación. Los animales se pesaron en una balanza digital (Sartorius, Alemania) con una precisión de 0.01 g, los días 0, 7 y 14.

II.4.2.2 Evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral

El ensayo se realizó según la guía metodológica de la Organización Internacional de Normalización (ISO 10993-10, 2001). Se formaron 2 grupos experimentales de 3 animales cada uno, un grupo tratado con las tabletas de tamarindo (GTT) y un grupo control (GC). Al GTT se le colocó un pellet de algodón embebido en polvo de tabletas de tamarindo humedecido con agua destilada, en la bolsa malar derecha de cada animal; al GC se le aplicó un pellet de algodón con agua destilada. La aplicación se realizó, por el método de exposición aguda, con intervalos de exposición de 5 min. cada hora, durante 4 horas consecutivas.

Los animales fueron observados hasta 7 días después de la aplicación y se pesaron en una balanza digital (Sartorius, Alemania), los días 0, 4 y 7. Después de 24 horas del ensayo, se examinaron macroscópicamente las bolsas males de cada animal. Se sacrificaron por dislocación cervical. Las bolsas males de cada uno fueron extraídas y fijadas en formaldehído al 10% y se procesaron para la realización del examen histopatológico.

La determinación del índice de irritación se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos por la norma de referencia: 0, no irritante; 1-4, irritante mínimo; 5-8, irritante medio; 9-11, irritante moderado y 12-16, irritante severo (ISO 10993-10, 2003).

II.4.2.3 Análisis estadístico

Actividad antioxidante y hepatoprotectora

Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple para evaluar diferencias entre las medias en cada variable de los grupos experimentales y se aplicó un test HSD (Distancia Honestamente Significativa, por sus siglas en inglés) de Tukey para evaluar los grupos con medias diferentes. En todos los casos se verificó la normalidad de la data a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó para ello el software Statgraphics Plus (v.5.1 StatEase Co. MA. USA. 2001) con un nivel de significación $p > 0.05$.

Toxicidad aguda oral y de la irritabilidad de la mucosa oral

Para determinar diferencias estadísticas significativas entre las medias del peso corporal de los grupos experimentales, se realizó en cada tiempo una prueba t de student. Se verificó la normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homocedasticidad (Anova) de los datos, con un nivel de significación de 0.05. Se utilizó para ello el software Statgraphics Plus (v.5.1 StatEase Co. MA. USA. 2001).

II.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora

II.4.3.1 Diseño experimental

Se conformaron al azar 5 grupos de 7 animales cada uno definidos como:

Grupo I (Control): Se le administró diariamente, los 7 días de ensayo, carboximetilcelulosa (Quiminet, Mexico) al 0.5% en agua destilada, por vía oral, en una cantidad equivalente a 1 ml por cada 100 g de peso corporal del biomodelo experimental.

Grupo II (Grupo tetracloruro): se le administró tetracloruro de carbono (Sigma Aldrich, USA) en una cantidad equivalente a 0.5 ml/kg de peso corporal del biomodelo experimental. Se administra con aceite de oliva, en una relación de 1:3, por vía intraperitoneal, el segundo día de experimentación.

Grupo III (Grupo Silimarina): se le administró diariamente, por vía oral durante los 7 días de ensayo, 150 mg/kg de peso corporal de Silimarina (Cosmos, México),

suspendida en carboximetilcelulosa (QuimiNet, México) al 0.5 % en agua destilada, en una cantidad equivalente a 1 ml por cada 100 g de peso corporal.

Grupo IV (Grupo Tabletas 100): se le administró diariamente, por vía oral durante los 7 días de ensayo, el equivalente a 100 mg/kg de peso corporal de sólidos totales de EBT contenido en las tabletas, pulverizadas y suspendidas en carboximetilcelulosa al 0.5 % en agua destilada, en una cantidad equivalente a 1 ml por cada 100 g de peso corporal.

Grupo V (Grupo Tabletas 200): se le administró diariamente, por vía oral durante los 7 días de ensayo, el equivalente a 200 mg/kg de peso corporal de sólidos totales del EBT contenido en las tabletas, pulverizadas y suspendidas en una cantidad correspondiente a 1 ml por cada 100g de peso corporal de carboximetilcelulosa al 0.5% en agua destilada.

El segundo día del experimento se administró por vía intraperitoneal a los grupos del III al V, la misma dosis de tetracloruro de carbono que la administrada al grupo II.

A todos los grupos se les suministró (*ad-libitum*) agua y pienso convencional para ratas durante los 7 días de experimento (Yossef y col., 2011). Los animales se sometieron a ayuno 18 horas antes de ser sacrificados, previa narcosis con éter etílico.

II.4.3.2 Preparación de las muestras de ensayo

Tratamiento de la muestra para el estudio de la actividad antioxidante

La determinación de los indicadores de estrés oxidativo evaluados en este trabajo se realizó en un homogeneizado de hígado de los biomodelos experimentales. Se extrajo el hígado de cada animal y se lavó con solución fría (1-4°C) de cloruro de sodio 0.9%. Se secaron con papel secante para eliminar el exceso de humedad y se pesaron en una balanza analítica (Sartorius, Alemania) con una precisión de 10⁻⁴g. Se cortaron en fragmentos pequeños utilizando tijeras y se les añadió 5 ml de solución tampón Tris de pH 7,2, a temperatura de de 1- 4 °C por gramo de tejido hepático. Se centrifugó a 15 000 rpm, durante 5 minutos, manteniendo la temperatura a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se conservó en hielo hasta el momento del ensayo (menos de una hora).

Tratamiento de la muestra para el estudio de la actividad hepatoprotectora

Los ensayos bioquímicos se realizaron en suero. Se realizó una incisión en el abdomen hasta visualizar la aorta descendente, de donde se extrajo la sangre utilizando una jeringa estéril previamente heparinizada. La sangre se centrifugó a 1500 rpm y se colectó el sobrenadante, conservándolo en hielo hasta su utilización (no más de una hora).

II.4.3.3 Observaciones clínicas

Durante la evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora se realizaron observaciones clínicas para evaluar el comportamiento de los biomodelos experimentales. Se observó si aparecían posibles reacciones tóxicas, para registrar su inicio, tiempo de aparición, desaparición y recuperación, así como cualquier otro signo que evidenciara afección del estado de salud del animal (color y apariencia de las mucosas, apariencia de la piel y el pelaje, apariencia de los ojos etc.) y para registrar si ocurría la muerte de algún animal, y en qué momento.

II.4.3.4 Determinación del peso relativo del hígado

Se determina el peso relativo del hígado, dividiendo la masa del hígado de cada animal entre el peso corporal, y se expresó como por ciento. Esta es una medida estandarizada que permite, comparar la masa promedio del hígado de los diferentes grupos experimentales con mejor precisión (Heba y col., 2011)

II.4.3.5 Actividad antioxidante

II.4.3.5.1 Determinación de malonildialdehído

El ensayo se realizó por el método de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (Reckhgel, 1967; Han y col., 2000). Mediante esta técnica se midió la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm, producida por el cromógeno formado en la reacción del ácido tiobarbitúrico y el malonildialdehído (MDA), utilizando un espectrofotómetro *Pharmacia Biotech*, 80-2106-00 (Inglaterra).

II.4.3.5.2 Determinación de superóxido dismutasa

Se realizó la determinación utilizando el *Kit* reactivo *Superoxide Dismutase Assay Kit*,

de *Cayman Chemical Company*, con la variante de curva de calibración propuesta por Malstron, utilizando un patrón de MDA (CCC, USA) (Malstron y col., 1975). El método se basa en la detección del radical superóxido, generado por la acción de la enzima xantina-oxidasa, utilizando una sal de tetrazolio. Se produce una sustancia coloreada (Formazán), cuya intensidad de color, medida a 450 nm (*Pharmacia Biotech*, 80-2106-00, UK,) es proporcional a la actividad de la enzima SOD (CCC, 2010). Una unidad de actividad de la enzima SOD se define como la cantidad de enzima que produce la dismutación del 50% del radical superóxido.

II.4.3.5.3 Determinación de catalasa

La actividad de esta enzima se determinó utilizando el kit de ensayo para catalasa CAT-240 de *Applied Bioanalytical Labs (USA)*. Se empleó la variante de curva de calibración, con un patrón de la enzima catalasa (*Applied Bioanalytical Labs, USA*) (Aebi, 1984). El método se basa en medir la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno catalizada por la catalasa a una longitud de onda de 240 nm, utilizando un espectrofotómetro *Pharmacia Biotech*, 80-2106-00 (UK). La actividad de la catalasa se expresa en unidades internacionales por litro (UI/L).

II.4.3.5.4 Determinación de glutatión reducido

Para la determinación de glutatión reducido (GSH) se utilizó el *Kit reactivo Sigma-Aldrich® de Glutathione Assay Kit*, basado en un ensayo cinético que mide la disminución de la concentración del ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) (*Sigma Company, USA*), al reducirse por la acción del GSH a ácido tionitrobenzoico (TNB). La velocidad de esta reacción es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. Se determina la intensidad de la coloración amarilla por espectrofotometría (*Pharmacia Biotech*, 80-2106-00, UK) a 412 nm (Akerboom y Sies, 1981). La concentración de GSH se expresa en mg/g de tejido hepático.

II.4.3.6 Actividad hepatoprotectora

II.4.3.6.1 Determinación de aminotransferasas

La determinación de las aminotransferasas se realizó por el método propuesto por Bergmeyer (Bergmeyer y col., 1986). La reacción enzimática de la AST con una

mezcla del ácido α -cetoglutarico y el ácido L-aspártico produce *glutamato* y oxalacetato. De igual modo, la reacción entre la enzima ALT con una mezcla de α -cetoglutarico y de L-alanina produce *glutamato* y piruvato. El glutamato que se genera en ambos casos, reacciona con la 2,4, dinitrofenilhidracina (*Sigma Aldrich, USA*) y produce una hidrazona compleja, que al adicionarle hidróxido de sodio (*Sigma Aldrich, USA*), origina un color rojo, cuya absorbancia a 510 nm (*Pharmacia Biotech, 80-2106-00, UK*) es proporcional a la actividad de la enzima en cada caso. Una UI/L de AST o ALT se define como la liberación de 1mmol de piruvato por minuto, por litro de suero, incubado a 37°C.

II.4.3.6.2 Fosfatasa alcalina

Se utilizó para la determinación de la fosfatasa alcalina (FAL), el método propuesto por Kaplan (Kaplan y col., 1984^a). La fosfatasa alcalina a pH 10,4, cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol y fosfato. La velocidad de formación del p-nitrofenol, es proporcional a la concentración catalítica de la fosfatasa alcalina en la muestra ensayada. Se determinó la actividad de la FAL por espectrofotometría a 405 nm en un espectrofotómetro *Pharmacia Biotech, 80-2106-00 (UK)*. Una unidad internacional (UI) de fosfatasa alcalina es igual a la cantidad de la enzima que transforma 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar.

II.4.3.6.3 Gamma-glutamyltranspeptidasa

Se determinó la actividad de esta enzima por el método propuesto por Gendler (Gendler, 2001). La gamma-glutamyltranspeptidasa (GGT) cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamilo de la L- γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida (Spinreact, España) a la glicilglicina, formando durante la reacción el ácido 5-amino-2-nitrobenzoico. La velocidad de formación de este ácido, es proporcional a la concentración catalítica de GGT en la muestra y se determinó por espectrofotometría a 405 nm (*Pharmacia Biotech, 80-2106-00, UK*). Una unidad internacional (UI) de esta enzima, es igual a la cantidad de la misma que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar.

II.4.3.6.4 Bilirrubina total y directa

La determinación de bilirrubina total y directa se realizó utilizando el método de Kaplan (Kaplan y col., 1984^b).

La bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotado para formar azobilirrubina de color púrpura. La intensidad de esta coloración es proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra y se midió por espectrofotometría a 540 nm (*Pharmacia Biotech*, 80-2106-00, UK).

II.4.3.6.5 Proteínas totales

Se utilizó el método de Biuret, siguiendo el procedimiento estándar propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011). Las proteínas forman un complejo de color púrpura al reaccionar con iones de cobre (II) (Cu^{2+}) en medio alcalino. La intensidad de este color medida a 540 nm en un espectrofotómetro *Pharmacia Biotech*, 80-2106-00 (UK) se relaciona directamente con la concentración de proteínas en la muestra. Se utilizó una curva de calibración con el uso de un patrón de albúmina bobina (Sigma, USA), de concentración conocida. La concentración de proteínas en sangre se informó en g/100ml.

II.4.3.6.6 Lípidos totales

Se empleó el método de la fosfovainillina, que se fundamenta en la reacción entre lípidos insaturados con el ácido sulfúrico caliente, donde se generan iones carbonio. Estos últimos, reaccionan con la fosfovainillina produciendo un color rosado cuya intensidad es proporcional a la concentración de lípidos totales en la muestra (Kaplan y col., 1984^c). Para la determinación se utilizó el método adición de estándar utilizando un patrón de Lípidos totales (Spinreact, España). La concentración sérica de lípidos totales se expresó en mg/100ml.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Obtención y estandarización del extracto blando

La calidad de un extracto blando materia prima para la preparación de cualquier forma farmacéutica, dependerá totalmente de la calidad del extracto fluido del cual proviene (Sharapin 2000). Por esta razón, en este trabajo se optimizó el proceso de obtención del extracto fluido de *Tamarindus indica* L, de manera que tuviera una adecuada concentración (cualitativo y cuantitativo) de metabolitos secundarios (Escalona y col., 2011^a).

Los polifenoles y flavonoides, son metabolitos a los que se ha asociado, en la literatura, las propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras de los extractos de *Tamarindus indica* L (Medina, 2001; Komutarin, 2004; Dehesa, 2006; Pimple y col., 2007). Las condiciones evaluadas en el proceso extractivo para la preparación del extracto fluido, garantizaron un adecuado contenido de metabolitos en el EBT, especialmente de polifenoles y flavonoides. A la vez, permitieron que se extrajeran conjuntamente con estos metabolitos, importantes microelementos como el selenio, níquel, hierro, cinc y cobre (Escalona y col., 2010^b). Estos microelementos participan en el balance redox celular (Martin y col., 1984) y su actividad antioxidante ha sido extensamente informada. Se ha informado esta acción para el selenio (Logercio y Federico, 2003; SCSEDR, 2000, Mira y col., 2002), y se ha informado una participación importante del cobre y el cinc como cofactores de las diferentes isoenzimas de la superóxido dismutasa (Martin y col., 1985; SCSEDR, 2000; León y col., 2005).

Los valores de los límites de calidad resultantes del proceso de estandarización del EBT se muestran en la tabla VIII. La gran riqueza de metabolitos secundarios que posee este nuevo Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de origen natural, lo convierte en un principio activo con una gran potencialidad antioxidante, adecuado para la preparación de formulaciones farmacéuticas, y en especial de formas sólidas.

III.1.1 Evaluación de las propiedades organolépticas

Los diez lotes de extracto blando de tamarindo (EBT) obtenidos presentaron un color marrón oscuro, con aspecto viscoso y fuerte olor a fruta madura. El sabor del mismo

Tabla VIII. Límites de calidad propuestos para el extracto blando estandarizado de las hojas de *Tamarindus indica* L.

No	Parámetro	Media	Mínimo	Máximo
1	Color		Marrón oscuro	
2	Olor	Característico de la fruta madura		
3	Sabor	Ácido y astringente		
4	Sólidos totales (%)	63.53	57.89	69.17
5	Densidad relativa a 30°C (g/ml)	1.311	1.179	1.443
6	pH	3.20	3.08	3.32
7	Cenizas totales (%)	1.00	0.79	1.20
8	Polifenoles totales (%)	6.19	4.26	8.12
9	Flavonoides (%)	1.09	0.92	1.27

resultó ácido, característico del sabor de la pulpa de la fruta y con cierta astringencia.

III.1.2 Evaluación de las propiedades físicas y fisicoquímicas

Para evaluar la variabilidad total entre los diez lotes estudiados, para cada uno de los parámetros evaluados, se realizó una prueba F seguido de una prueba de Rangos múltiples de Duncan. La prueba F mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de todos los parámetros estudiados, para los 10 lotes evaluados, con un 95% de confiabilidad. Sólidos totales ($F=39.02$, $p= 0.0000$); densidad relativa ($F=366,20$, $p= 0,0000$); cenizas totales ($F=102.78$, $p= 0.0000$) y pH ($F= 23.93$, $p= 0.0000$).

Los grupos homogéneos que se encontraron dentro de cada uno de los parámetros, se correspondieron con los lotes preparados con la droga vegetal recolectada en el mismo estado fenológico de la planta. Este hecho fue informado por primera vez por Escalona y colaboradores (Escalona y col., 2010^b). Se informó además, que la mayor concentración de metabolitos en esta planta, se presenta en los meses correspondientes al estado de fructificación de la planta (Febrero- Marzo- Abril: lotes 1 y 2), seguido por el estado de floración (noviembre – enero: lotes 8, 9 y 10) y luego por el estado vegetativo (Mayo – Octubre; lotes 3, 4, 5, 6 y 7), en ese orden.

Los valores de pH obtenidos muestran diferencias estadísticas significativas, aunque físicamente no son muy diferentes, pues son valores bastante ácidos (3.08-3.32), debido a la presencia en el EBT de los ácidos cítrico, tartárico y málico (El-Siddig, 2007) y otros metabolitos como los fenoles y taninos presentes (Dehesa y col., 2006, Escalona y col., 2010^b) que también aportan acidez al medio.

El contenido de cenizas totales es una medida de la presencia de elementos metálicos en el extracto. Su presencia incrementa en la medida que disminuye el contenido alcohólico del menstruo utilizado en la preparación del extracto fluido. Los valores de cenizas totales obtenidos estuvieron comprendidos entre 0.79 y 1.20%.

III.1.3 Contenido de polifenoles y flavonoides

La comparación estadística de los valores medios de concentración de polifenoles en los 10 lotes de EBT estudiados, arrojó diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($F=103.09$, $p =0.0000$). Los valores de concentración de flavonoides se

encontraron en un intervalo de 0.92-1.27%. De igual modo, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los lotes para la concentración de estos compuestos ($F= 63.23$, $p=0.0000$).

En la figura 3 se presenta el gráfico de medias para la concentración de polifenoles con el intervalo de confianza en cada caso. Este comportamiento es propio de la variabilidad en la producción de estos metabolitos por la planta, en los diferentes estados fenológicos. Obsérvese que los lotes 1 y 2, que se corresponden con el estado fenológico de fructificación muestran la mayor concentración de estos metabolitos. Esta variabilidad es consecuencia, además, de la influencia de las precipitaciones, la temperatura, la humedad y el ciclo solar de la zona donde se encuentra la población de la cual se colecta la droga cruda para la preparación de los extractos.

La metodología 3σ con el nivel de confiabilidad utilizado para este estudio, permite asegurar que, el 95% de las veces que el extracto blando de tamarindo sea preparado por este método, en las condiciones experimentales descritas, los valores de cada uno de los parámetros se encontrarán entre los límites mostrados en la tabla VIII.

La metodología 3σ con el nivel de confiabilidad utilizado para estos análisis, permite asegurar que, los valores de cada uno de los parámetros mostrados en la tabla VIII, se alcanzarán el 95% de las veces que el EBT sea preparado por este método.

III.1.4 Contenido de elementos minerales del extracto blando de *Tamarindus indica* L.

Los elementos cuantificados con la técnica de ICP en el extracto blando de tamarindo se muestran en la tabla IX. Este análisis permitió determinar elementos que aparecen referidos en la literatura, como integrantes de diferentes mecanismos reguladores del equilibrio redox celular. Entre los más importantes en este sentido, se encuentran el cobre, cinc, níquel y selenio (Khanzada y col., 2008).

Se destacan altos valores de selenio, cobre y en especial de cinc, por tratarse de elementos de especial relevancia en el equilibrio redox de los organismos vivos. La composición acídica, rica en ácido tartárico, cítrico y en vitamina C (El Siddig,

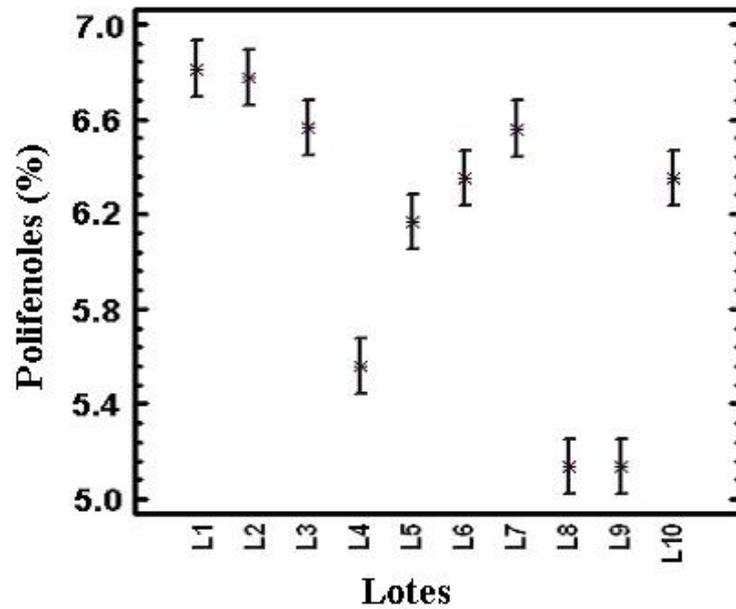


Figura 3. Gráfico de medias para la concentración de polifenoles de los 10 lotes de extracto blando de tamarindo, con el intervalo de confianza.

Tabla IX. Concentración de microelementos en el extracto blando de las hojas de tamarindo. (n=3)

Elemento	Cu	Fe	Se	Mo	Co	Ni	Mn	Cr	V	Zn	Pb	Cd
ppm	122.35	233.14	68.24	1.36	10.39	4.75	30.25	3.10	1.95	126.25	10.26	2.08

2007); la presencia de microelementos como níquel, cinc, selenio y cobre (Escalona y col., 2010^b), la riqueza de polifenoles y flavonoides (Dehesa, 2006; Escalona y col., 2010^b); la presencia de ácidos grasos como el oleico y el palmítico (Escalona y col., 2010^b), y potencian la actividad antioxidante del fitocomplejo del extracto blando del tamarindo.

III.1.5 Huella espectral UV

La figura 4 presenta la huella espectral del extracto blando de tamarindo en la región UV. En esta región se identificaron tres picos de absorción característicos. El primero entre 201 y 203 nm, el segundo entre 272 y 274 nm y el tercero de 323 a 327 nm.

La huella espectral UV o “fingerprint” de un extracto vegetal, es una característica distintiva de este. La intensidad de la absorción en cada uno de los picos identificados, puede emplearse como un indicador adicional para evaluar la efectividad del proceso extractivo, así como la conveniencia de las condiciones del método de concentración del extracto fluido durante la preparación del extracto blando. La utilización de la huella espectral, conjuntamente con el resto de los parámetros estudiados, permitirá garantizar la integridad de este producto herbario libre de etanol, como un nuevo Ingrediente Farmacéutico Activo para la elaboración de formas farmacéuticas líquidas y sólidas.

III.2 Preformulación de las tabletas de *Tamarindus indica* L

La elección en este trabajo de desarrollar alternativas terapéuticas sólidas, responde fundamentalmente a la mayor estabilidad de las mismas, a la facilidad de su utilización y a la versatilidad que se puede lograr en el proceso de formulación de estas formas farmacéuticas.

III.2.1 Evaluación de interferencias de los excipientes en el método de determinación de polifenoles en las mezclas binarias

La aplicación del método de Folin Ciocalteu (BP, 2010) a las soluciones de todos los excipientes, mostró lecturas de absorbancia igual a 0 durante 24 horas a la longitud

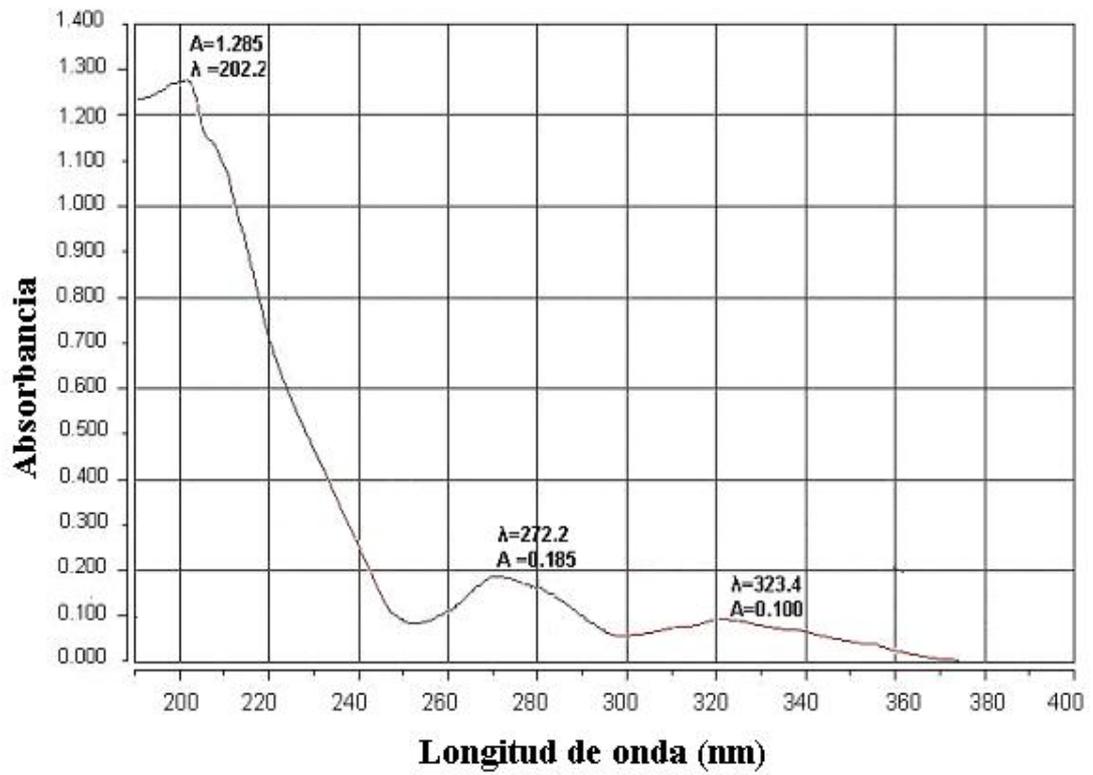


Figura 4. Huella espectral del extracto blando de las hojas de tamarindo en la región ultravioleta.

Dilución 0.5 g de extracto blando en 500 ml de solución hidroalcohólica al 72%.

de onda de 700 nm. Esta observación se repitió para cada uno de los excipientes por separado y para la mezcla de todos los excipientes sin adición del EBT.

Al añadir a la mezcla de todos los excipientes con el EBT el reactivo de Folin Ciocalteu, seguido de la solución básica, se produjo rápidamente una coloración azul violeta, que al medir en el espectrofotómetro, utilizando como blanco la mezcla de excipientes sin adición de EBT dio una absorbancia igual a 0.113.

La figura 5 muestra la curva obtenida en el análisis de regresión de la absorbancia de las muestras de EBT en presencia de los excipientes, con relación al volumen de extracto blando añadido, así como los estadígrafos que la validan. Como puede observarse, la absorbancia de la mezcla de excipientes, que funge como placebo, no absorbió a esta longitud de onda. El valor de R^2 superior a 0.999, mostró que este método permite cuantificar polifenoles en el EBT, en presencia de los excipientes que conformarán la tableta, sin interferencias. El intervalo de confianza del intercepto (- 0.0157- 0.00513), incluyó el valor 0, lo que demostró la proporcionalidad de la respuesta en presencia de los excipientes. El test de Cochran mostró un p-valor igual a 0.3667, indicando homocedasticidad de la respuesta (absorbancia) en todos los niveles de concentración ensayados.

Con estos dos ensayos se demostró que los excipientes no reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu en las condiciones ensayadas. Por tanto se puede medir sin interferencias, la concentración de polifenoles en el extracto blando en presencia de los excipientes, y el método puede aplicarse, además, para la cuantificación de polifenoles en los estudios de preformulación realizados al EBT y las mezclas binarias con los excipientes (Adeneye y Brittain, 2008).

III.2.2 Evaluación de las mezclas binarias

El color y el olor de cada una de las mezclas binarias luego de 30 días de tratamiento a 30°C se mantuvo con la misma frescura del extracto blando tratado individualmente a esta temperatura. Se mantiene una coloración marrón uniforme, con un olor agradable a la fruta madura, característico del extracto blando recién preparado, lo que puede interpretarse como un indicador de la estabilidad de cada una de las mezclas ensayadas a esta temperatura.

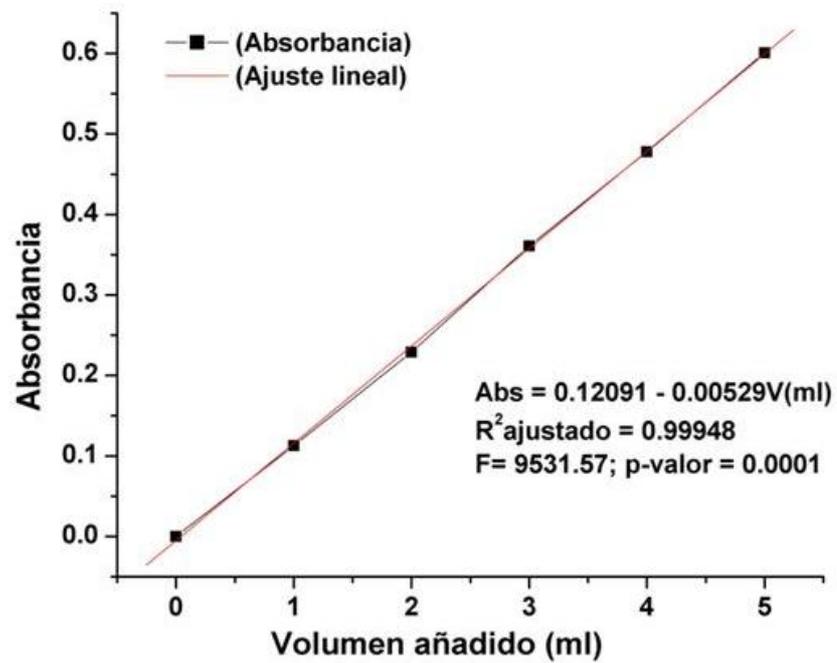


Figura 5. Recta de regresión entre el volumen de extracto blando de *Tamarindus indica* L y la absorbancia, en la evaluación de la interferencia de los excipientes en la respuesta del método del Folin Ciocalteau, durante la determinación de polifenoles en las mezclas binarias.

En las mezclas estudiadas a las temperaturas de 45°C y 60°C se observó un oscurecimiento del color marrón y el olor se tornó ácido. Este oscurecimiento se observó también en el EBT tratado individualmente a las mismas temperaturas; ello sugiere que está ocurriendo un proceso de degradación que puede atribuirse, preliminarmente a la oxidación y/o la polimerización de los polifenoles presentes en el extracto.

III.2.2.1 Influencia de la temperatura en las mezclas binarias

Se obtuvo para las seis mezclas excipiente- EBT ensayadas, a la temperatura de 30°C valores de concentración de polifenoles entre 96.03 y 100.56% después de 30 días de estar mezclados íntimamente (Figura 6).

Este resultado muestra muy poca variabilidad en la concentración de polifenoles a esta temperatura, y la diferencia de concentración de polifenoles es muy baja. Ello puede atribuirse a la sensibilidad del método espectrofotométrico, teniendo en cuenta que en el extracto blando de tamarindo, 0.95 mg de polifenoles equivale a un 1%, entonces puede asegurarse que la concentración de polifenoles se mantiene estable en las mezclas a este valor de temperatura.

A temperaturas de 45°C y 60°C (Figuras 7 y 8) se observó una importante disminución de las concentraciones de polifenoles en las mezclas y en el extracto blando de tamarindo tratado individualmente. Esta disminución en la concentración de polifenoles sugiere que el oscurecimiento de las mezclas, podría estar relacionado con procesos de oxidación o de polimerización de los fenoles y taninos, produciendo compuestos que no reaccionan con el reactivo de Folin Ciocalteu en el EBT, y no a posibles interacciones del EBT con los excipientes ensayados (Tourinho y col., 2008). Este efecto es mucho más intenso cuando el EBT es tratado a 60°C.

Otro elemento que sugiere que son los polifenoles los responsables del oscurecimiento de las mezclas, es que el proceso también ocurre al EBT tratado individualmente a las mismas temperaturas, y por otra parte, que la concentración de polifenoles no se afecta cuando los excipientes se encuentran en solución acuosa conjuntamente con el EBT, medio en el que los procesos físico químicos ocurren con mayor facilidad (Sbarbati, 2000; Gibson, 2005; Adeyeye y Brittain, 2008).

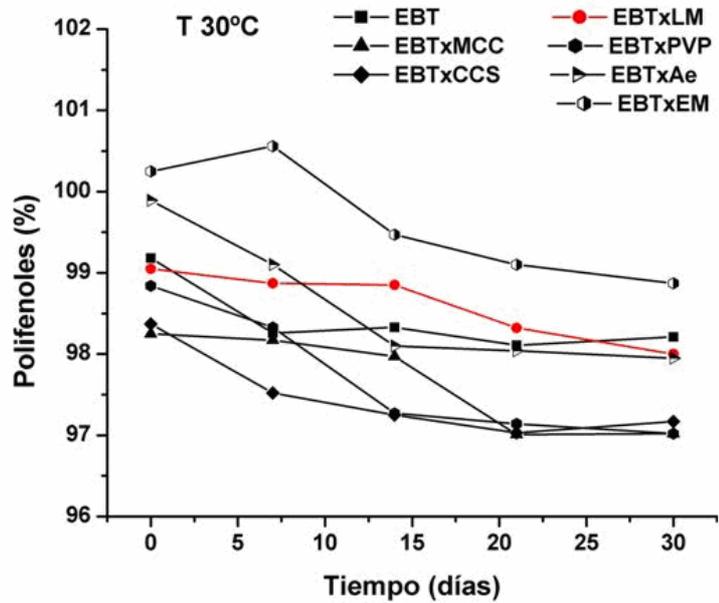


Figura 6 Comportamiento de la concentración de los polifenoles en las mezclas binarias tratadas a la temperatura de 30°C durante de 30 días.

Leyenda: EBT extracto blando de tamarindo, MCC celulosa microcristalina, LM lactosa monohidratada, CCS croscarmelosa sódica, PVP polivinilpirrolidona, EM estearato de magnesio Ae dióxido de silicio coloidal.

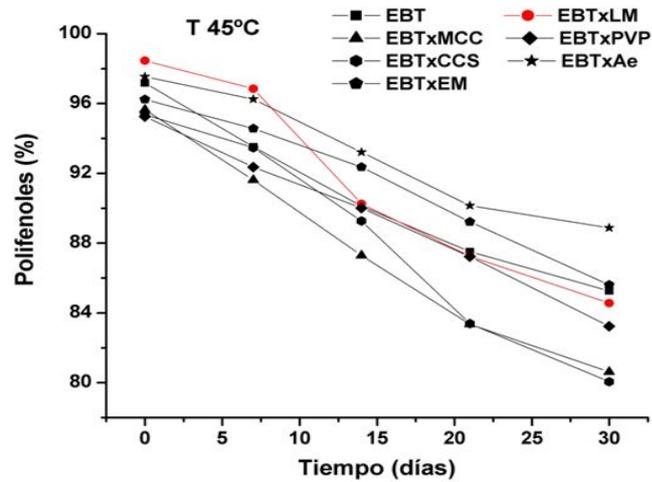


Figura 7. Comportamiento de la concentración de los polifenoles en las mezclas binarias tratadas a la temperatura de 45°C durante de 30 días.

Leyenda: EBT extracto blando de tamarindo, MCC celulosa microcristalina, LM lactosa monohidratada, CCS croscarmelosa sódica, PVP polivinilpirrolidona, EM estearato de magnesio Ae dióxido de silicio coloidal.

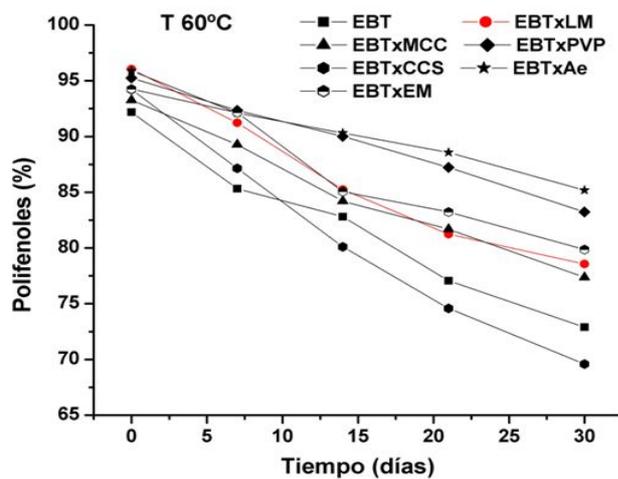


Figura 8. Comportamiento de la concentración de los polifenoles en las mezclas binarias tratadas a la temperatura de 30°C durante de 30 días.

Leyenda: EBT extracto blando de tamarindo, MCC celulosa microcristalina, LM lactosa monohidratada, CCS croscarmelosa sódica, PVP polivinilpirrolidona, EM estearato de magnesio Ae dióxido de silicio coloidal.

III.2.3 Análisis térmico

Para corroborar las evidencias anteriores, se realizó el análisis térmico a un extracto liofilizado de *Tamarindus indica* L, al que previamente se le determinó la concentración de polifenoles. En la figura 9 se muestra el termograma correspondiente al extracto liofilizado. Se puede observar una pérdida de masa (proceso endotérmico), desde que comienza el proceso de calentamiento. En una primera etapa se pierden 3,59 mg (0,86%), esta pérdida a temperaturas tan bajas puede ser consecuencia de la pérdida de una pequeña masa de aceites esenciales, que pudo quedar fisisorbida dentro de la masa del extracto, en el que al aparecer los primeros puntos calientes, se liberan con la absorción de calor.

La segunda etapa de pérdida, también endotérmica, es propia de la disminución de la humedad del extracto (humedad libre fisisorbida dentro la masa del sólido). Este proceso ocurre hasta una temperatura de 42.5°C, donde comienza a ocurrir un proceso exotérmico, asociado a un incremento de masa de 3.71 mg (0.89%). Este proceso es debido, probablemente, a la formación de una atmósfera alrededor de la muestra que puede estar constituida por la humedad que se ha liberado, por dióxido de carbono y en el caso específico de esta muestra, pudieran estar presentes también en dicha atmósfera, aceites esenciales y otras sustancias volátiles (desorbidas a estos valores de temperaturas, véase que son bastante bajos). Todos estos compuestos pueden propiciar procesos oxidativos.

A continuación ocurre otro proceso endotérmico, en el cual la muestra libera toda la humedad que posee, llegando hasta una temperatura de 82.5°C. La pérdida de masa se detiene y coincide con el valor de humedad del extracto una vez seco 17.44 mg. El gráfico ATD confirma las observaciones realizadas, una gran endoterma desde 0 hasta 52.5°C, y a este valor de temperatura se verifica un proceso exotérmico, coincidente con la ganancia de masa observada en la curva termogravimétrica, y a partir de 57.7°C se verifica una nueva ganancia de energía, hasta que el extracto de tamarindo no pierde masa.

Una vez terminado este estudio, se realizó la determinación de polifenoles y se verificó la pérdida de concentración de estos metabolitos en el extracto liofilizado de tamarindo, resultando la recuperación de polifenoles de solo un 23%. Esto obedece a

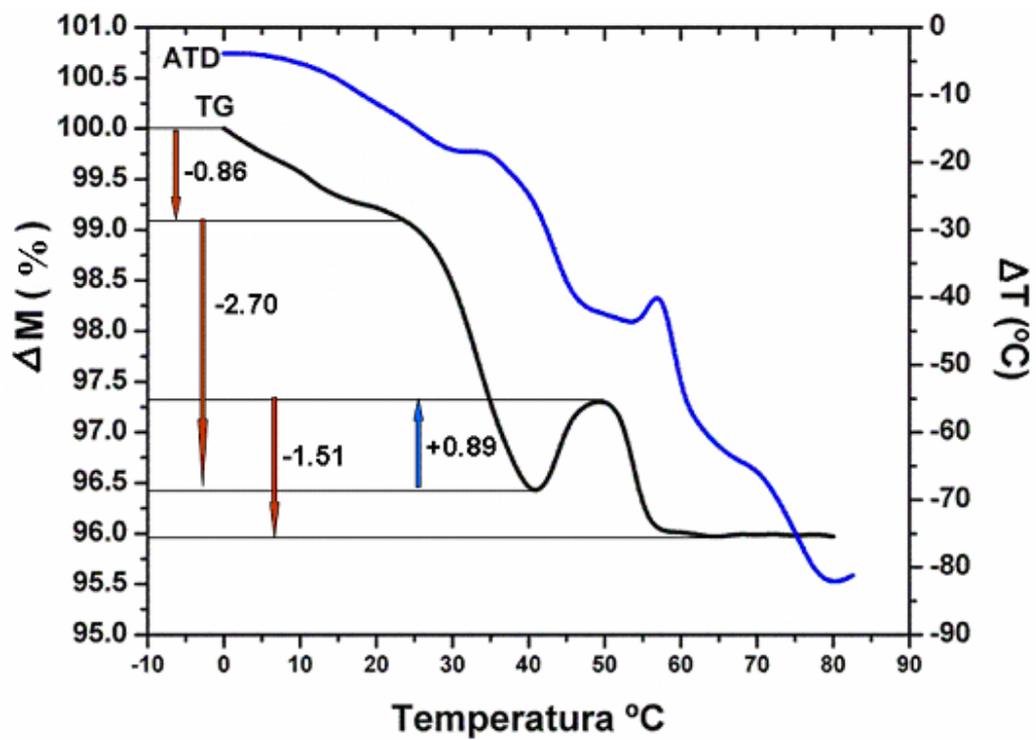


Figura 9. Termogramas del extracto liofilizado de *Tamarindus indica* L.

Se observa la ganancia de masa igual a 0.89%, a la temperatura de 42.5°C. ATD, análisis térmico diferencial, TG, análisis termogravimétrico.

que el extracto seco se sometió a una temperatura de 80°C-100°C, que afectó la concentración de estos metabolitos.

Este estudio aportó más evidencias sobre la inestabilidad del EBT al ser sometido a la acción de la temperatura, lo que sugiere que la causa de la disminución de la cantidad de polifenoles en las mezclas binarias y del extracto blando de tamarindo tratado térmicamente a 45 y 60°C, se debe a procesos oxidativos en los que intervienen los polifenoles, y probablemente, otras sustancias oxidables presentes en el extracto. Por tanto la temperatura para todos los estudios utilizando extractos de la hojas de tamarindo, deberán ser inferiores a los 42.5°C.

La complejidad de la composición de los extractos vegetales, hace muy difícil el establecimiento de un criterio definitivo acerca de su estabilidad, y sobre la ocurrencia de posibles interacciones con los excipientes seleccionados para una formulación.

Blasco y col. (2005) refieren, que el método de Folin Ciocalteu cuantifica de forma general, las sustancias oxidables presentes en un sustrato, más allá que la mera presencia de polifenoles, como generalmente se ha tratado. Este método ha sido un criterio extensamente utilizado en la práctica farmacéutica, tanto para estudios de estabilidad como para la cuantificación de polifenoles en extractos naturales (ej. Vimang, polvo materia prima), en el desarrollo de tabletas tanto para los estudios de estabilidad como para el control de la calidad (Tabletas Vimang 600 mg, Registro CECMED N-06-188-HMO, y Tabletas de anamú 600 mg, Registro CECMED N-04-182-HLO), y aparece como el método de elección en la farmacopea británica (BP, 2010) para la cuantificación de polifenoles en productos naturales.

III.2.4 Cromatografía de capa delgada

La necesidad de evidencias que permitieran establecer un criterio de estabilidad del EBT en toda su complejidad y no referido a un solo componente, como es la determinación de polifenoles, condujo a la utilización de la cromatografía de capa delgada, para establecer posibles patrones que permitieran comparar de forma cualitativa, la estabilidad química del EBT.

En la figura 10 se presentan los cromatogramas realizados al extracto blando de

tamarindo tratado a temperaturas de 30°C, 45°C y 60°C. Los valores de Rf obtenidos para cada mancha en cada tratamiento realizado se presentan en la Tabla X.

El extracto blando a temperatura de 30°C, mostró tres manchas bien definidas a valores de Rf de 0.63, 0.71 y 0.85. En cambio el extracto tratado a 45°C mostró una única mancha, bien ancha, que presenta tres zonas superpuestas, no completamente definidas a un valor de Rf de 0.74 con una pequeña cola (Figura 10). Esta es una evidencia de que a esta temperatura, ha ocurrido un cambio en el EBT, probablemente asociado a la aparición de compuestos de degradación, que no se separan completamente en las condiciones cromatográficas empleadas. El extracto blando de tamarindo tratado a 60°C presentó una larga cola, desde el punto de aplicación y una mancha alargada y oscura en un valor de Rf de 0.67. Estos cambios en los cromatogramas indican la ocurrencia de un proceso degradativo causado por la temperatura (Pachaly, 1994; Adeyeye y Brittain, 2007).

Estos resultados permiten afirmar que la temperatura posee un marcado efecto en la estabilidad del extracto y sus preparaciones, degradándose el mismo desde los 45°C donde comienza a disminuir la resolución en los cromatogramas, con la aparición de colas y la superposición de manchas a 45°C, las que no se separan en la placa a los 60°C.

La combinación en el estudio de estabilidad del EBT y de sus mezclas binarias, utilizando el método de Folin Ciocalteau, ya no solo como indicador de la cantidad de polifenoles, sino como un “índice de la capacidad antioxidante total” (Blasco y col, 2005) del extracto blando de tamarindo y sus preparaciones, con la técnica de cromatografía de capa delgada, constituye una herramienta indispensable para realizar los estudios futuros de estabilidad de la formulación de tabletas.

III.2.5 Propiedades físico mecánicas de los granulados preformulados

Los resultados obtenidos durante la caracterización de los granulados de las tres formulaciones estudiadas en la etapa de preformulación se presentan en la tabla XI. Las tres formulaciones mostraron buenas propiedades de flujo y de compresibilidad, con una humedad residual menor del 3%, dichas propiedades permiten que las tres

Tabla X. Resumen de los valores de los Rf obtenidos en los cromatogramas del extracto blando de tamarindo tratado a diferentes valores de temperatura.

Manchas	EBT (30°C)	EBT (45°C)	EBT (60°C)
1	0.63	0.74	0.67
2	0.71	-	-
3	0.85	-	-



Figura 10. Cromatogramas del extracto blando de las hojas de tamarindo tratado individualmente a diferentes valores de temperatura por una semana. Soporte Sílica gel GF₂₅₄, sistema de solvente: N-butanol: ácido acético: 2-propanol (4.2:4, v/v/v), tiempo de desarrollo 2.5 horas, revelador luz UV 254 nm.

Tabla XI. Parámetros de calidad evaluados a los granulados de las tres formulaciones preliminares evaluadas. Se reporta el valor medio con la desviación estándar entre paréntesis.

Fórmula	IC (%)	RH	Vf (g/cm².s)	Ar (°)	TP (um)	HR (%)
1	^b 15.95 (0.59)	^a 1.19 (0.01)	^c 7.68 (0.37)	^a 35.89 (0.58)	^b 505.90 (2.14)	^b 2.81 (0.07)
2	^a 16.23 (0.06)	^a 1.19 (0.09)	^b 8.33 (0.17)	^b 34.10 (0.42)	^a 557.96 (11.30)	^a 2.61 (0.06)
3	^a 12.92 (1.25)	^b 1.15 (0.02)	^a 9.38 (0.15)	^c 30.55 (0.43)	^a 537.73 (4.27)	^c 2.39 (0.16)
F	9.87	9.34	9.42	14.13	37.71	38.40
p	0.0127	0.0144	0.0141	0.0054	0.0004	0.0004

F prueba F de Fisher, p probabilidad, $\alpha = 0.05$, n=5

IC índice de compresibilidad, RH índice de Hausner, Vf velocidad de flujo, Ar ángulo de reposo, TP tamaño de partícula, HR humedad residual.

Letras diferentes en igual columna indican diferencias significativas; $p < 0.05$

formulaciones puedan ser utilizadas en un proceso de fabricación de comprimidos de acuerdo con la literatura especializada (Vila, 2000; Gibson, 2004; USP, 2007).

Por otra parte, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las medias de las tres formulaciones en todas las variables respuestas. El índice de Hausner y el índice de compresibilidad de la tercera fueron diferentes estadísticamente del resto de las formulaciones, siendo la tercera la que presentó los mejores valores de estas propiedades (USP, 2007).

En la formulación 2 se alcanzó una mayor humectación de la masa del granulado, lo que trajo como consecuencia un mayor tamaño de partícula de los gránulos. Este hecho se asocia un empaquetamiento más abierto de la masa de granulado que se reflejó en un índice de compresibilidad más alto, y en una mayor fluidez comparada con la formulación 1, aunque la fluidez de ésta resultó menor que la formulación 3. Esta diferencia en el flujo es el resultado de la influencia de la humedad residual, siendo este parámetro menor en la formulación 3, que hace al granulado menos cohesivo y por tanto, que fluya mejor. La menor humedad residual en la formulación 3 podría ser el resultado de un mejor proceso de secado y por tanto de una mejor consolidación del granulado.

El tamaño de partícula de las formulaciones 2 y 3 fue homogéneo, pero la formulación número 2 presentó un mayor valor de humedad residual. La distribución del tamaño de partícula en las tres formulaciones fue normal ($p > 0.05$) de la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Mongomery, 2000).

En general de las tres formulaciones la tercera mostró las mejores propiedades de flujo y compresibilidad (menor valor de índice de compresibilidad, índice de Hausner y ángulo de reposo y mayor valor de velocidad de flujo) probablemente como consecuencia de una menor humedad residual y de un tamaño de partícula más homogéneo.

III.2.6 Propiedades tecnológicas de las tabletas preformuladas

La tabla XII muestra los valores de los parámetros de calidad determinados en las tabletas para cada formulación. El análisis de la dureza mostró la no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de las tres formulaciones.

Tabla XII. Propiedades tecnológicas de las tabletas de Tamarindus indica L. obtenidas durante la etapa de preformulación. Se reporta el valor medio con la desviación estándar entre paréntesis.

Fórmula	Dureza (Kg/F Monsanto)	Friabilidad (%)	Tiempo de desintegración (min.)	Altura (mm)	Masa promedio (%)
1	^a 5.76 (0.06)	^a 0.86 (0.04)	^b 13.67 (0.58)	^a 5.93 (0.02)	^a 595.62 (6.35)
2	^a 5.92 (0.61)	^a 0.89 (0.05)	^a 15.67 (0.58)	^b 5.67 (0.02)	^a 589.43 (8.58)
3	^a 5.85 (0.03)	^a 0.74 (0.04)	^b 13.67 (0.58)	^c 5.45 (0.03)	^a 597.75 (7.14)
F	0.17	5.53	4.66	652.17	2.45
p	0.8492	0.0435	0.0061	0.0000	0.0580

F prueba F de Fisher, p probabilidad, $\alpha = 0.05$, n=5

Letras diferentes en igual columna indican diferencias significativas; $p < 0.05$

Aunque la dureza aumenta en el orden $1 < 3 < 2$, todos los valores se clasifican como BUENOS según la literatura especializada (Lieberman y Lachman, 1981; Adeyeye y Brittain, 2008). La formulación 3 mostró el menor valor de friabilidad, siendo significativamente diferente del resto de las formulaciones.

El comportamiento de las variables friabilidad y tiempo de desintegración, con relación a la dureza de las tabletas se muestra en La figura 11. El tiempo de desintegración se mantuvo constante para valores de dureza por debajo de 5.85 (Kg/F Monsanto) y aumentó para valores superiores; esto está determinado por el incremento de la dureza y la disminución de la cantidad de desintegrante en la formulación 3.

Se obtuvieron bajos tiempos de desintegración en todas las formulaciones, elemento muy favorable en una tableta, pues de forma general, mientras más rápido desintegra una tableta más tempranamente comenzará la acción del fármaco, aunque no siempre es posible establecer esta correlación (CDER, 1997). Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las formulaciones 1 y 3 con relación a la 2 (Tabla XII).

La figura 12 evidencia que en el centro de adición del desintegrante (4.0%), los valores de dureza y tiempo de desintegración son más altos que en los extremos. Ello pudiera estar relacionado con una mayor dureza de esa formulación, por lo que para su optimización futura, se deberá tener en cuenta esta observación.

La masa promedio mostró homogeneidad en las tres formulaciones. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la altura de las tabletas para las tres formulaciones. Esto se atribuye probablemente, a las diferencias que se producen en el llenado de la matriz, debido a la desigualdad en el empaquetamiento, producidas por una mayor fricción interparticular, elemento demostrado en las diferencias del ángulo de reposo y la velocidad de flujo de los granulados de cada formulación (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col, 1992).

La friabilidad se mantuvo en todos los casos por debajo del 1% y con muy poca variabilidad como consecuencia del aumento de la dureza, siendo mayor en la formulación 2, como consecuencia de granos más grandes, que comprimen con una mayor irregularidad superficial y producen mayor friabilidad.

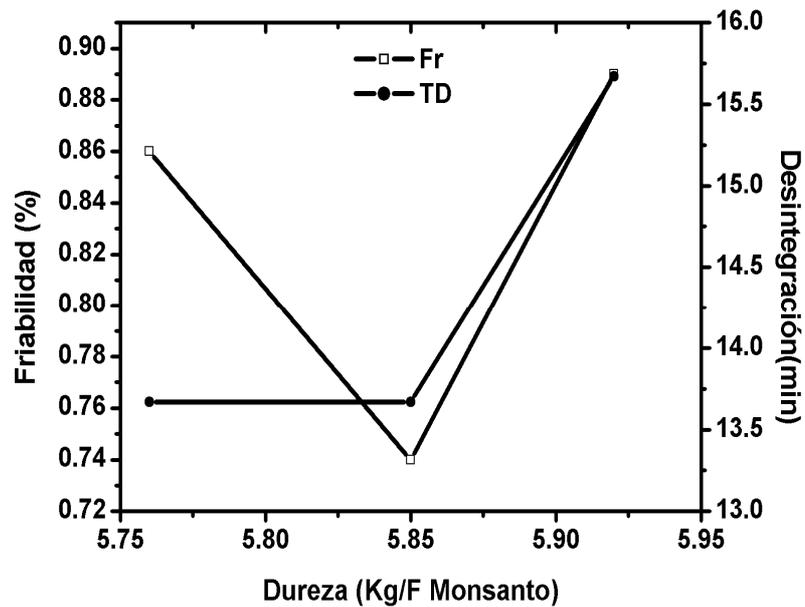


Figura 11 Relación dureza vs. Tiempo de desintegración-friabilidad encontrada en las tabletas de *Tamarindus indica* L. durante la experimentación preliminar.

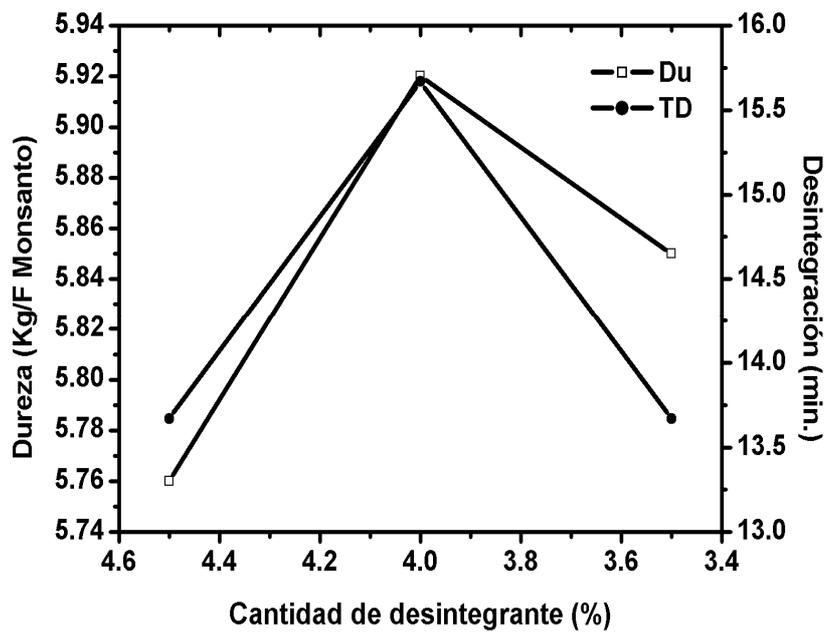


Figura 12. Relación cantidad de desintegrante vs. dureza-desintegración encontrada en las tabletas de *Tamarindus indica* L. durante la experimentación preliminar.

III.3 Formulación de las tabletas de *Tamarindus indica* L.

III.3.1 Evaluación de la calidad de los granulados

En la tabla XIII se presenta la matriz de resultados del diseño de mezcla D-optimal para la evaluación de las propiedades físico-mecánicas de los granulados. Para validar el ajuste de los modelos matemáticos encontrados para cada variable respuesta, se verificó que los datos de cada una de ellas provenían de una distribución normal ($p > 0,05$, prueba de Kolmogorov –Smirnov, tabla XIII).

Se utilizaron como criterios para la selección de los modelos, los coeficientes de determinación ajustados (R^2) y su relación con la bondad de predicción (el coeficiente de determinación predicho (R^2 predicho o Q^2), no debe haber una diferencia mayor de 0,3 entre R^2 y Q^2) (Gabrielsson y col., 2002), la significación del modelo (bondad de ajuste con $p < 0,05$), la suma cuadrada de los residuos predichos (PRESS, debe ser la menor entre los modelos propuestos), y la significación de las pruebas de la pérdida de ajuste (LoF) y el test de Durbin-Watson (DW) con $p > 0,05$. Esta última prueba (DW) fue evaluada con el software StatGraphics Plus 5.1 (StatEase Co. MA. USA), para comprobar la correlación de los residuos, pues la existencia de correlación residual, indica que existe otro modelo, que puede explicar mejor la variabilidad de la respuesta (Cooks y Weisberg, 1986; Ericsson y col., 1998).

III.3.1.1 Índice de compresibilidad

Las propiedades de flujo y compresibilidad son críticas cuando se trabaja con formulaciones sólidas de productos naturales. Los granulados preparados con extractos fluidos y blandos, así como con extractos vegetales secos, generalmente tienen muy mala fluidez, son higroscópicos y comprimen con dificultad (Sharapin, 2000; Lira y col., 2005^b).

El índice de compresibilidad o de Carr es un indicador de la facilidad que posee una masa de polvos o granulados para asentarse por su propio peso y está en función de la relación entre sus densidades aparentes de vertido y de asentamiento (Carr, 1965, Lieberman y Lachman, 1981; Gibson, 2005). Aquellos polvos con un índice de compresibilidad menor de 10 poseen una excelente compresibilidad, los que tienen este índice entre 11 y 15 poseen buena compresibilidad y así sucesivamente hasta

Tabla XIII. Matriz de resultados donde se presentan datos de la evaluación de la calidad de los granulados. Se informa el valor medio \pm la desviación estándar.

No.	IC (%)	RH	Vf	Ar ($^{\circ}$)	HR (%)
1	22,22 \pm 1,23	1.29 \pm 0,04	8.11 \pm 1,32	30,26 (1,26)	1,98 (0,04)
2	22,55 \pm 1,26	1.29 \pm 0,07	8.10 \pm 1,45	29,90 (0,98)	1,98 (0,05)
3	23,65 \pm 1,39	1.31 \pm 0,07	7.95 \pm 1,23	31,21 (1,25)	1,98 (0,09)
4	22,58 \pm 1,40	1.29 \pm 0,08	8.15 \pm 1,19	31,58 (1,56)	1,97 (0,11)
5	23,22 \pm 1,25	1.30 \pm 0,09	8.08 \pm 1,34	27,12 (1,47)	1,97 (0,10)
6	21,98 \pm 1,51	1.28 \pm 0,08	8.12 \pm 0,98	28,89 (1,22)	1,99 (0,05)
7	19,12 \pm 1,60	1.24 \pm 0,09	8.73 \pm 1,38	25,52 (0,98)	1,99 (0,26)
8	21,12 \pm 1,63	1.27 \pm 0,08	8.62 \pm 1,21	32,13 (1,23)	1,97 (0,13)
9	21,85 \pm 1,25	1.28 \pm 0,07	8.41 \pm 1,56	24,65 (1,77)	1,99 (0,19)
10	22,91 \pm 1,35	1.30 \pm 0,09	8.11 \pm 1,27	30,90 (1,91)	1,99 (0,20)
11	23,05 \pm 1,26	1.30 \pm 0,09	8.14 \pm 0,98	30,33 (2,01)	1,99 (0,13)
12	22,25 \pm 1,57	1.29 \pm 0,07	8.19 \pm 1,15	27,36 (1,11)	1,97 (0,14)
13	19,01 \pm 1,62	1.23 \pm 0,20	8.85 \pm 1,18	24,65 (0,74)	1,97 (0,18)
14	23,54 \pm 1,02	1.31 \pm 0,06	7.99 \pm 1,37	30,25 (1,27)	1,98 (0,22)
K-S	0.1944	0.1762	0.2059	0.2205	0.2236

K-S, p valor de la prueba de Kolmogorov –Smirnov. IC, índice de compresibilidad; RH, índice de Hausner; Vf, velocidad de flujo; Ar, ángulo de reposo; HR, humedad residual
n=3.

38, en intervalos de 5, le continúan propiedades regulares, aceptables, pobres y muy pobres (USP, 2007).

La compresibilidad de los polvos y granulados, así como otras propiedades reológicas depende de la forma de las partículas, de su tamaño y distribución, así como de la densidad de las mismas (Shekunov y col., 2007). El análisis del diseño de experimento mostró que el índice de compresibilidad se ajustó a un modelo *cúbico* que explica el 99,11% de la variabilidad de esta propiedad y puede predecir el 89,43% de la misma (Tabla XIV). El modelo no presentó falta de ajuste significativa, con $p > 0,05$ y no se encontró correlación residual con un 95% de confiabilidad. En consecuencia puede afirmarse que este modelo es el mejor predictor de esta variable, aspecto que se valida con el pequeño valor de PRESS obtenido.

La figura 13 presenta la influencia de cada excipiente sobre la variable índice de compresibilidad. El excipiente que presentó mayor influencia sobre esta variable fue la polivinilpirrolidona, encontrándose los menores valores de índice de compresibilidad aproximadamente en el centro de adición (5,56%), seguido por la celulosa microcristalina, y luego la lactosa monohidratada, ambas con similar comportamiento, pero en ambos casos los menores valores se encontraron en el límite superior de adición de estos excipientes.

Este efecto se debe a que la celulosa microcristalina posee propiedades aglutinantes que coadyuvan conjuntamente con la polivinilpirrolidona a la obtención de gránulos más esféricos. A este efecto se suman las buenas propiedades de la lactosa monohidratada como excipiente de compresión directa, lo que permite formar un gránulo más esférico que fluye y se empaqueta muy bien por su propio peso (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col., 1992).

En la tabla XIV puede observarse que existen fuertes interacciones entre la polivinilpirrolidona y los otros dos excipientes estudiados. El coeficiente de la interacción LM*MCC*PVP es el mayor de todos y posee signo negativo, lo que implica que dicha interacción es la que más favorece la disminución del índice de compresibilidad. Este es un hecho muy poco informado en la literatura, donde se plantea que las interacciones de tercer orden son raras veces significativas (Ericsson y col., 1998; Montgomery, 2000).

Tabla XIV. Resumen de los criterios estadísticos de los modelos ajustados para cada una de las variables respuestas, en la evaluación de las propiedades físico mecánicas de los granulados en el proceso de optimización

Estadístico	IC	RH	Vf	Ar
Modelo	Cúbico	Cúbico	Lineal	Inverso(1/vAr)
R ² Ajustado	0,9911	0,9384	0,9402	0,5286
Q ²	0,8943	0,8170	0,9234	0,3609
PRESS	2,8633	0,0111	4,0707	0,0006
Falta de ajuste (p-valor)	0.2711	0.5667	0.4120	0.4993
Bondad de ajuste (p-valor)	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0064
Durbin – Watson (p-valor)	0,2354	0,3698	0,0879	0,0587
Magnitud de los efectos e interacciones				
LM	7,87	-0,03	7,29	0,038
MCC	-72,08	-6,18	7,93	0,042
PVP	9,70	0,35	15,47	0,028
LM*MCC	170,26	15,11	-	-
LM*PVP	60,57	5,17	-	-
MCC*PVP	215,38	16,60	-	-
LM*MCC*PVP	-246,90	-21,01	-	-
MCC*PVP*(MCC-PVP)	97,59	6,22	-	-

Nota: coeficientes significativos (95 % confiabilidad) de los modelos ajustados, expresados en pseudo componentes. IC, índice de compresibilidad; RH, índice de Hausner; Vf, velocidad de flujo; Ar, ángulo de reposo. LM lactosa monohidratada, MCC celulosa microcristalina, PVP polivinilpirrolidona.

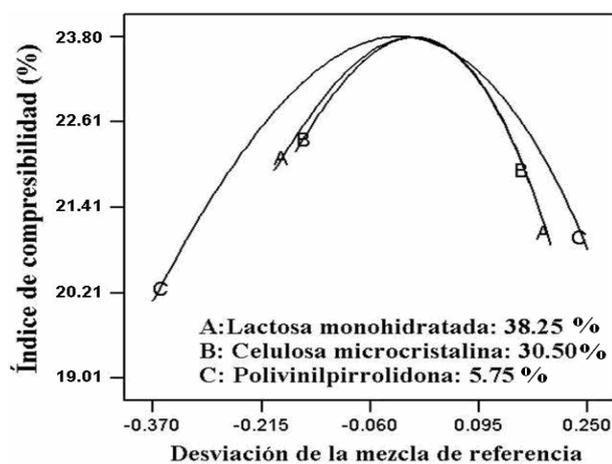


Figura 13. Comportamiento del índice de compresibilidad de los granulados en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación.

Desde el punto de vista tecnológico, la causa probable de este comportamiento reside en que la celulosa microcristalina también posee propiedades aglutinantes y en el EBT están presentes sustancias resinosas, carbohidratos (aproximadamente 1.2%) y otros metabolitos que pueden formar películas rígidas, además de las que se forman con la polivinilpirrolidona. Todo esto contribuye a que el granulado sea más duro y firme, tienda a ser más esférico, y por ello, más compresible (Rowe, 2009).

La evidencia del efecto de estas sustancias en el extracto se ha observado durante el proceso de obtención de un extracto seco a partir del extracto blando, utilizando solamente lactosa monohidratada y dióxido de silicio coloidal, donde se ha obtenido un grano esférico y duro, con buenas propiedades de flujo y compresibilidad.

III.3.1.2 Índice de Hausner

El índice de Hausner es un parámetro que proporciona criterios acerca de las propiedades de flujo y compresibilidad de polvos y granulados. Aquellos que se encuentran cercanos a uno muestran una excelente fluidez y compresibilidad como consecuencia de una mejor acomodación, lo que es característico de partículas esféricas y distribuidas homogéneamente, que reducen su fricción y fluyen con facilidad. Por el contrario, aquellos cercanos a 1.6 fluyen y comprimen mal (Gibson, 2004; USP, 2007).

El índice de Hausner se afecta por los mismos factores que el índice de compresibilidad, y su cálculo también es dependiente de las densidades (USP, 2007; BP, 2010). El índice de Hausner en esta investigación se ajustó a un modelo *cúbico* que explica el 93,84% de la variabilidad de esta respuesta y puede predecir el 81,70% de la misma (Tabla XIV). La prueba de bondad de ajuste presentó un p-valor menor de 0,05 y no se encontró significación estadística en la prueba de DW, que mostró que no existe correlación residual ($p > 0,05$). Este elemento permite afirmar que el modelo ajustado obtenido es el mejor predictor del índice de Hausner en función de las cantidades de excipientes empleados en este estudio.

El excipiente que mostró mayor efecto sobre esta variable fue la polivinilpirrolidona, observándose (Figura 14) que del centro al límite inferior de la cantidad de este

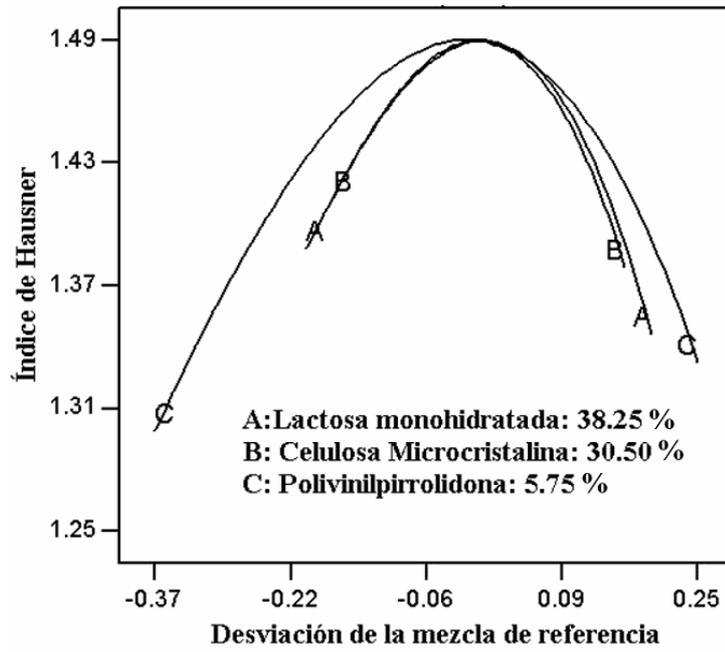


Figura 14. Comportamiento del índice de Hausner en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación.

excipiente en la mezcla, disminuye el índice de Hausner o sea, se mejoran las propiedades de flujo y compresibilidad. Sin embargo, tanto la lactosa monohidratada como la celulosa microcristalina favorecen menores valores de índice de Hausner cuando sus concentraciones en la fórmula están en el límite superior de adición. Esto puede comprobarse en el modelo ajustado obtenido para esta variable. En los coeficientes para estos dos excipientes tienen signo negativo, y además la interacción de ambos con la polivinilpirrolidona posee un fuerte efecto negativo (Tabla XIV), que potencia el mejoramiento de esta variable (su disminución) y por tanto mejoran las propiedades de flujo y compresibilidad de los granulados de *Tamarindus indica* L. Este resultado concuerda con el de otros autores que han investigado la formulación de tabletas con extractos naturales (Lira y col., 2005^b). Se destaca el hecho de la significación de una interacción de tercer orden, lo que no es común en la literatura (Montgomery, 2000; Ericsson y col., 1998), y que pudiera estar relacionada con la presencia de los demás excipientes de la formulación.

III.3.1.3 Velocidad de flujo

La facilidad de una masa de polvos o granulados para fluir a través de las tolvas y tuberías se expresa en Tecnología Farmacéutica como la velocidad de flujo (Iraizoz y col., 1992; Gibson, 2005; USP, 2007). Una buena movilidad de la masa de granulados en la fabricación de tabletas es imprescindible para garantizar un correcto llenado de la matriz durante el proceso de compresión de tabletas. Adicionalmente garantiza que si ocurren paradas en un proceso productivo, o sencillamente por un almacenamiento más largo que lo habitual, la masa de polvo o granulado fluya por los conductos y tuberías destinados al respecto, sin causar contratiempos (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col., 1992).

La velocidad de flujo depende de la forma de las partículas, de su rugosidad, de las cargas electrostáticas que se producen entre las partículas que conforman el fluido o entre éstas y las paredes que la confinan (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col., 1992; Shekunov y col., 2007). Esta es una propiedad crítica en granulados preparados con extractos vegetales, que generalmente son higroscópicos, y fluyen y comprimen mal (Sharapin, 2000; Lira y col., 2005^a).

Durante el proceso de experimentación se observó que la velocidad de flujo se ajustó a un modelo lineal (Tabla XIV), que explica el 94,02% de la variabilidad de ésta en función de las cantidades de los excipientes utilizados en la formulación. Este modelo puede predecir (Q^2) el 92,34% de la variabilidad, con una magnífica bondad de ajuste (p -valor $<0,05$) y un pequeño valor de PRESS.

De los tres excipientes estudiados la polivinilpirrolidona fue la que mostró mayor influencia en esta propiedad, obteniéndose las mejores propiedades de flujo del centro al nivel superior de adición. La lactosa monohidratada y la celulosa microcristalina tuvieron aproximadamente el mismo valor del efecto (Tabla XIV), y se encontró poca diferencia numérica entre los valores de velocidad de flujo obtenidos para todas las posibles mezclas, si se observa desde el límite inferior al límite superior de adición de estos dos excipientes (Figura 15).

Los mayores valores de velocidad de flujo fueron obtenidos en el límite superior de adición de polivinilpirrolidona, pues al aumentar la cantidad de aglutinante se obtienen gránulos más esféricos, disminuye la producción de finos en los granulados, lo que hace que los gránulos fluyan muy bien. Sin embargo los valores de velocidad de flujo obtenidos cuando la polivinilpirrolidona está del límite inferior al centro de adición pueden considerarse como buenos (Iraizoz y col., 1992), principalmente para un granulado que contiene extractos vegetales, pues como aparece informado en la literatura, estos materiales al secarse, casi siempre fluyen y comprimen mal (Sharapin, 2000; Lira y col., 2005^a; Souza y col., 2006).

III.3.1.4 Ángulo de reposo

El ángulo de reposo es otra medida utilizada en Tecnología Farmacéutica para evaluar las propiedades de flujo de los polvos y granulados. Cuando un granulado tiene valores de ángulo de reposo menor o igual a 30° se considera que fluye libremente, si este valor es superior a 40° se considera un flujo muy pobre. Mientras más cerca de 30° mejores serán las propiedades de flujo del granulado (USP, 2007).

Muchos factores afectan el ángulo de reposo de un granulado. Al aumentar la humedad residual del granulado, aumenta la cohesión de los granos y esto tiende a aumentar el ángulo de reposo. Se plantea que a menor tamaño de partícula mayor

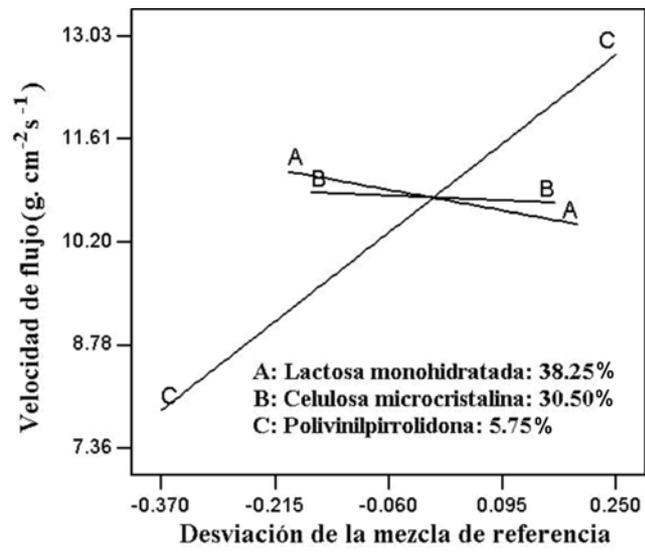


Figura 15. Comportamiento de la velocidad de flujo de los granulados, en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación.

será el ángulo de reposo, aunque esta relación es mucho más pronunciada para tamaños de partícula menores de 150 μm (Lieberman y Lachman, 1981). La forma de las partículas también afecta el ángulo de reposo. A mayor esfericidad de los granos, se propicia un menor rozamiento, menos cohesión y mejor fluidez. La cantidad de aglutinante utilizado afecta el flujo de los granulados, por lo general su aumento produce granos más duros, esféricos y menos friables (Lira y col., 2005^a; Lira y col., 2005^b). También la producción de partículas menores de 150 μm (los llamados finos) es menor y las propiedades de flujo se ven favorecidas (Danish y Parrott, 1981, Lieberman y Lachman, 1981).

El ángulo de reposo se ajustó a un modelo lineal inverso ($1/\sqrt{Ar}$), con mal coeficiente de regresión ajustado y mala capacidad de predicción (solo un 36%, Tabla XIV), por lo que este modelo no puede utilizarse para realizar predicciones. El excipiente que más influyó en la variabilidad de esta propiedad fue la polivinilpirrolidona (Figura 16). Obsérvese que el eje Y se corresponde con $1/\sqrt{Ar}$ lo que implica que el menor valor de ángulo de reposo se obtuvo en el nivel más bajo de adición. Este hecho resulta contradictorio (York, 1981) y podría explicarse porque la polivinilpirrolidona no es la única sustancia con propiedades aglutinantes en la formulación, sino que la celulosa microcristalina y la croscarmelosa sódica, también poseen propiedades aglutinantes y contribuyen con el mejoramiento de las propiedades de flujo de los granulados.

Los valores de ángulo de reposo obtenidos en todas las corridas experimentales, clasifican las propiedades de flujo como buenas, según la literatura especializada (USP, 2007). Esto se atribuye, probablemente, al hecho de que los granos tienden a ser más esféricos, la masa de polvo más homogénea y con buenos valores de humedad, que hacen que la masa pueda fluir con facilidad.

III.3.1.5 Humedad residual

La humedad residual no se ajustó a modelo alguno y se mantuvo entre 1.90% y 2.00% en todos los granulados preparados. Estos valores de humedad están dentro de los valores referidos en la literatura como adecuados para granulados obtenidos por granulación húmeda (Lieberman y Lachman, 1981). Esto permite la formación de un grano poco friable que contribuye a mantener la estabilidad del principio activo, y a

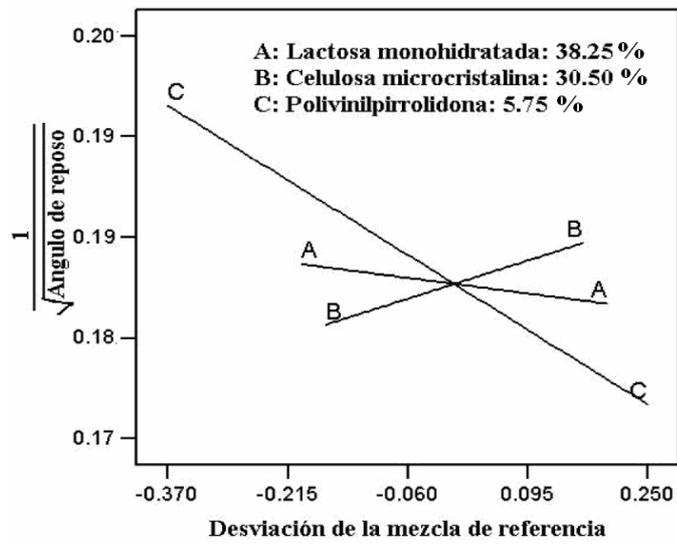


Figura 16. Comportamiento del ángulo de reposo en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación.

una buena compactación. Estos elementos permitirán obtener tabletas de *Tamarindus indica* L. con buenas propiedades tecnológicas (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col, 1992).

III.3.1.6 Tamaño y distribución del tamaño de partícula

El análisis por tamizado arrojó como resultado que todos los granulados poseían una distribución normal del tamaño de partícula. Se demostró durante el diseño que esta propiedad es independiente de los excipientes utilizados. En la tabla XV se presentan los resultados del análisis estadístico de la distribución del tamaño de partícula de cada uno de los granulados obtenidos. Todos los p-valores de la prueba de Kolmogorov–Smirnov fueron superiores a 0,05, lo que indica la normalidad de la distribución de tamaño de partícula de todos los granulados.

Este es un elemento importante que permitió obtener propiedades de flujo y de compresibilidad aceptables en todas las formulaciones ensayadas (USP, 2007), para un proceso de compresión de un granulado preparado con un extracto natural. La normalidad de una masa de polvos o granulados es más importante que el propio tamaño de partícula, pues permite que la masa del granulado a comprimir, se acomode mejor cuando es sometida a la presión de compresión, obteniéndose comprimidos uniformes, compactos y poco friables (Lieberman y Lachman, 1981; Iraizoz y col., 1992).

III.3.2 Evaluación de la calidad de las tabletas

III.3.2.1 Propiedades organolépticas

Las tabletas obtenidas en todas las corridas experimentales presentaron un color carmelita claro, con pequeños puntos alargados carmelita oscuro, propios del EBT, con un olor agradable a la fruta madura y un sabor ácido característico, debido a la presencia de los ácidos tartárico, cítrico y ascórbico.

III.3.2.2 Dureza

En la tabla XVI se presenta la matriz de resultados de la evaluación de la calidad de las tabletas. Se muestran sólo las variables respuestas estudiadas en el diseño.

Tabla XV. Resultados de la evaluación de la normalidad de la distribución del tamaño de partícula de los granulados de *Tamarindus indica* L. durante el proceso de formulación y optimización.

No	X _{media} (um)	DE	K-S
1	545,26	9.69	0.2090
2	531,04	13.03	0.2812
3	567,28	14.15	0.2053
4	570,14	14.17	0.1753
5	524,54	9.01	0.3406
6	526,21	10.18	0.1761
7	530,10	11.36	0.3335
8	547,89	20.65	0.3113
9	578,99	14.83	0.2512
10	565,48	15.99	0.1958
11	580,14	8.81	0.2346
12	511,11	11.27	0.1902
13	522,29	9.91	0.1749
14	531,22	14.34	0.2435

K-S: p-valor Kolmogorov-Smirnov, DE desviación estándar (StatGraphics Plus v.5.1)

Tabla XVI. Matriz de resultados donde se presentan los datos de la evaluación de la calidad tecnológica de las tabletas de *Tamarindus indica* L. en el diseño experimental

No	LM (%)	MCC (%)	PVP (%)	Du (N)	TD (min)	Fr (%)
1	38.00	31.00	5.50	39,5 ± 0,99	14,0 ± 1,14	0.74 ± 0,06
2	38.00	30.00	6.50	42,0 ± 0,98	12,5 ± 1,25	0.57 ± 0,09
3	38.38	30.25	5.88	39,5 ± 0,87	10,0 ± 1,13	0.82 ± 0,05
4	38.00	30.00	6.50	43,5 ± 0,84	12,5 ± 1,33	0.65 ± 0,08
5	37.00	31.00	6.50	42,5 ± 0,91	12,0 ± 1,25	0.66 ± 0,07
6	39.00	30.00	5.50	40,0 ± 0,87	13,5 ± 1,36	0.66 ± 0,06
7	39.00	31.00	4.50	36,5 ± 0,97	16,0 ± 1,57	0.72 ± 0,08
8	37.50	30.50	6.50	41,5 ± 0,99	19,0 ± 1,62	0.61 ± 0,09
9	39.00	30.50	5.00	38,5 ± 0,94	19,0 ± 1,62	0.85 ± 0,04
10	37.00	31.00	6.50	44,5 ± 0,92	14,0 ± 1,23	0.77 ± 0,07
11	37.63	30.75	6.13	42,0 ± 0,89	12,0 ± 0,99	0.69 ± 0,07
12	38.00	31.00	5.50	41,5 ± 0,86	12,5 ± 1,24	0.65 ± 0,04
13	39.00	31.00	4.50	35,8 ± 0,95	15,0 ± 1,36	0.88 ± 0,05
14	38.63	30.50	5.38	39,5 ± 0,99	15,0 ± 1,25	0.73 ± 0,08

LM, lactosa monohidratada; MCC, celulosa microcristalina, PVP, polivinilpirrolidona; Du, dureza; TD, tiempo de desintegración; Fr, friabilidad

Los resultados de dureza mostraron un comportamiento lineal con relación a la cantidad de excipientes utilizados. La polivinilpirrolidona fue el excipiente que más influyó en la variabilidad de este parámetro (Figura 17), aumentando con el incremento de la cantidad de este excipiente en la formulación. Ello puede estar relacionado con el hecho de que al aumentar la cantidad de aglutinante se produce una película mucho más gruesa, conformando una red muy rígida y mejor distribuida en el seno de la tableta, permitiendo así que se adhieran a ella mayor cantidad de partículas sólidas. Esto a su vez, puede contribuir a disminuir el tiempo de desintegración y mejorar la velocidad de liberación de los principios activos contenidos en la formulación. Este resultado coincide con lo informado por otros autores que han estudiado la influencia de la cantidad de aglutinante y de desintegrante en una formulación con un alto contenido de un extracto vegetal de *Maytenus ilicifolia*, observando que la dureza se hace dependiente de la cantidad de aglutinante añadido (Lira y col., 2005^a; Lira y col., 2005^b).

Con relación a la lactosa monohidratada, los valores más altos de dureza se encontraron en el límite inferior de adición. La celulosa microcristalina prácticamente no mostró influencia alguna sobre esta variable.

La literatura plantea que una mayor cantidad de aglutinante en las tabletas tiende a aumentar la dureza y el tiempo de desintegración (Lachman y Lieberman, 1981), sin embargo, esto dependerá de otros factores como son: el tipo de desintegrante utilizado y su mecanismo de acción (Zhao y Augsburg, 2005), la porosidad de la tableta, y la cantidad y el tipo de lubricante utilizado en el proceso de compresión (Sharma y Das Gupta, 2010).

Por estas razones, para la optimización de la formulación de estas tabletas se deberá tener en cuenta este elemento, obsérvese que la importancia de la cantidad de polivinilpirrolidona en la expresión es mucho mayor que la de la celulosa microcristalina y aún superior a la de la lactosa monohidratada. Sin embargo, hay que considerar que el empleo de lactosa monohidratada en tabletas, generalmente proporciona tabletas duras que desintegran rápidamente (Lieberman y Lachman, 1981; Ysimi, 2003).

La siguiente expresión matemática, representa el modelo ajustado para la dureza:

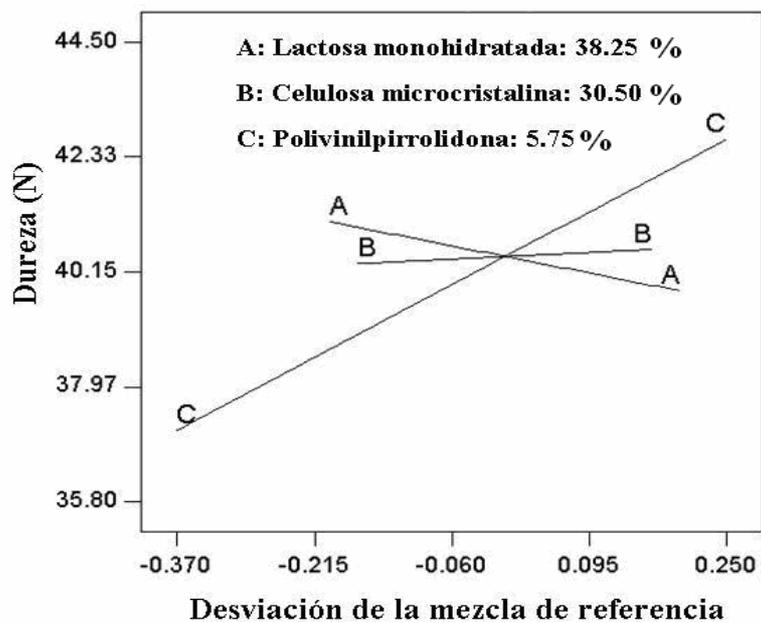


Figura 17. Comportamiento de la dureza de las tabletas de *Tamarindus indica* L en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación.

$$Du = 0,33813 * LM + 52,34983 * MCC + 244,03230 * PVP$$

Ecuación (8)

$$R^2 \text{ Aj.} = 0,8396 \quad Q^2 = 0,7782 \quad \text{PRESS} = 17,93$$

El modelo ajustado obtenido explica el 84% de la variabilidad de la dureza en función de la variabilidad de las cantidades de excipientes (R^2), y guarda una adecuada relación con Q^2 , capaz de predecir el 77.82% de la variabilidad de esta propiedad. Se plantea que mientras menor sea la diferencia entre R^2 y Q^2 mejor será la capacidad explicativa y predictiva del modelo, ello implica que la porción de la respuesta no explicada por él, sea muy pequeña por tanto, mejor será el modelo para la predicción en el proceso de optimización (Myers y Montgomery, 1995; Montgomery, 2000).

En la figura 18 se muestra el gráfico de contorno estimado para la dureza, se aprecia que los mayores valores de dureza se obtienen en el nivel superior de adición de polivinilpirrolidona y de celulosa microcristalina y en el nivel inferior de lactosa monohidratada. Esto ocurre probablemente, porque la MCC posee también propiedades aglutinantes que confieren a la tableta mayor dureza (Iraizoz y col, 1992; Rowe, 2009). En este sentido, debe mencionarse también, que la presencia de carbohidratos en el EBT (1.2%) y por tanto, en las tabletas contribuye también a la obtención de tabletas de una adecuada dureza.

III.3.2.3 Tiempo de desintegración

El tiempo de desintegración es el parámetro de calidad más importante que se evalúa a tabletas de rápida liberación. La desintegración de un comprimido es el paso inicial del proceso de absorción del principio activo contenido en este, y solo cuando comienza la desintegración es que se inician los demás procesos que ocurren para que el fármaco alcance la circulación sistémica.

El tiempo de desintegración de las tabletas de *Tamarindus indica* L. en todas las corridas experimentales osciló entre 10 y 19 minutos y sólo en tres de ellas superó los 15 min., tiempo que proponen las farmacopeas (USP, 2007; BP, 2010) para tabletas sin cubiertas. Este parámetro puede afectarse por muchas causas, razón por la cual el tecnólogo debe observarlo cuidadosamente para asegurar una óptima calidad en la formulación final.

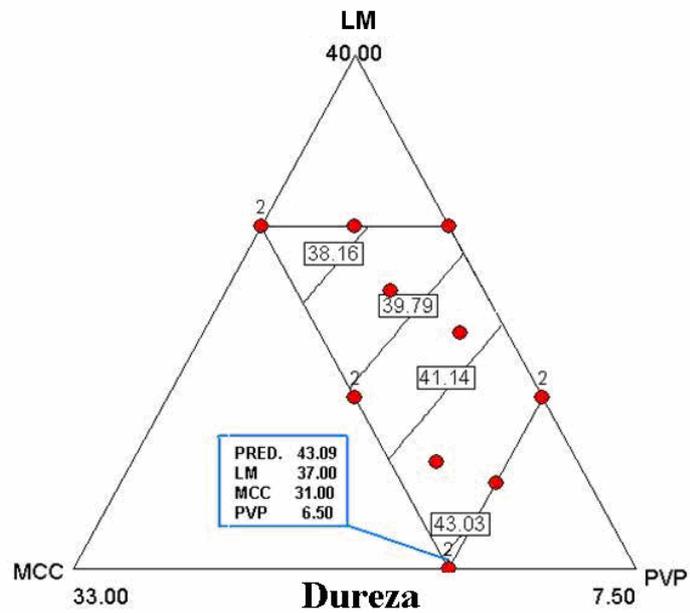


Figura 18. Gráfico de contornos para la dureza de las tabletas.

El recuadro indica el valor predicho (PRED) para dureza y para cada uno de los excipientes en ese punto.

MCC, celulosa microcristalina; PVP, polivinilpirrolidona, LM lactosa monohidratada

El tiempo de desintegración puede aumentar si se incrementa la fuerza de compresión (Lieberman y Lachman, 1981; Oseki y col., 2002; Lira y col., 2005^b), si disminuye la porosidad del comprimido (Lieberman y Lachman, 1981), según el tipo de agente desintegrante utilizado (Zhao y Augsburger, 2005) y si éste se encuentra intra o extragranular (Lieberman y Lachman, 1981; Banker y Rhodes, 2002). La cantidad y el tipo de lubricante utilizado, así como posibles interacciones entre los componentes de la formulación de tabletas también pueden incidir sobre el tiempo de desintegración (Lira y col., 2005^b). También lo afecta el hecho de que un excipiente pueda actuar de varias maneras a la vez, dentro de una misma formulación, como por ejemplo la celulosa microcristalina (Iraizoz y col., 1992; Kumar y col., 2001; Rowe, 2009) y el dióxido de silicio coloidal (Rowe, 2009), presentes ambos en esta formulación.

El excipiente que más afectó esta variable fue la polivinilpirrolidona, alcanzándose los menores tiempos alrededor del centro de adición (Figura 19), ocurriendo una gran inflexión en ambos extremos. Este comportamiento indica que deberá observarse con cuidado la cantidad de este excipiente en la formulación para lograr tabletas que desintegren más rápido.

Para este excipiente los menores tiempos de desintegración se observaron cuando la cantidad añadida a la formulación se encontró del centro al límite inferior de adición. Este comportamiento está relacionado con el hecho de que la polivinilpirrolidona posee propiedades desintegrantes (Rowe, 2009), que actúan conjuntamente con la croscarmelosa sódica cuando se humecta la tableta, y contribuye así a disminuir el tiempo de desintegración.

El comportamiento de esta variable dependiente se ajustó a un modelo cúbico que explica el 80% de la variabilidad y puede predecir el 65.5% de la misma. La pérdida de ajuste del modelo ajustado fue no significativa ($F=2,01$ y $p=0,2549$).

La expresión siguiente muestra la ecuación del modelo ajustado para el tiempo de desintegración.

$$TD = 1,5 \times 10^{-5} * LM + 2,1 \times 10^{-5} * MCC + 1,9 \times 10^{-6} * PVP - 7,2 \times 10^{-5} * LM * MCC - 4 \times 10^{-6} * LM * PVP - 4,8 \times 10^{-6} * MCC * PVP + 9,6 \times 10^{-6} * LM * MCC * PVP \quad \text{ecuación (9)}$$

$$R^2 \text{ Aj.} = 0,8057; Q^2 = 0,6557; \text{PRESS} = 29,93$$

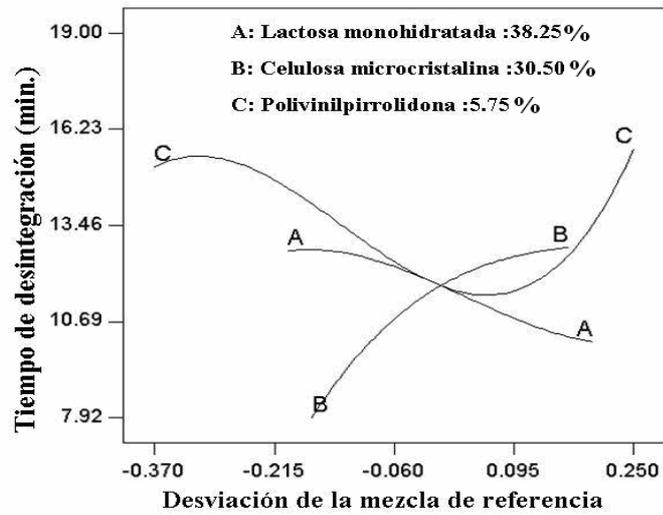


Figura 19. Comportamiento del tiempo de desintegración, en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación de tabletas de ***Tamarindus indica L.***

La figura 20 presenta el gráfico de contornos para el tiempo de desintegración. Se observa que los menores tiempos de desintegración se obtuvieron próximo al tercer cuarto de adición de aglutinante, o sea alrededor de 6% de polivinilpirrolidona. Este resultado podría considerarse contradictorio, ya que con frecuencia una mayor dureza puede aumentar el tiempo de desintegración (Lieberman y Lachman, 1981); sin embargo, como se ha evidenciado, la cantidad de aglutinante aumenta la dureza, pero no afecta el tiempo de desintegración, el que se mantiene dentro de los límites establecidos en las farmacopeas (BP 2010; USP 2007) para tabletas sin cubierta. Esta observación coincide con los resultados de otros investigadores, que han informado un comportamiento similar en investigaciones de formulación de tabletas, utilizando como principios activos extractos de otras plantas medicinales (Oseki y col., 2003; Ysimi, 2003).

III.3.2.4 Friabilidad

Los valores óptimos de friabilidad de tabletas sin cubiertas, deben estar por debajo del 1% (USP, 2007; BP, 2010). La friabilidad en general, aumenta cuando ocurre el defecto conocido como “decapado” de las tabletas, en presencia de un contenido de humedad final por debajo del 1% o cuando las tabletas son demasiado blandas (Lieberman y Lachman, 1981).

La polivinilpirrolidona fue el excipiente que mostró mayor influencia sobre la friabilidad de las tabletas de *Tamarindus indica* L., obteniéndose los valores más bajos en el nivel superior de adición (Figura 21). La lactosa monohidratada mostró un comportamiento similar al de la polivinilpirrolidona, y un efecto contrario se evidenció con la celulosa microcristalina, que aportó los valores más bajos de friabilidad en el nivel inferior de adición.

Esta variable se ajustó a un modelo lineal que explica el 73,12% ($F= 14.96$, $p=0,0007$) de su comportamiento con relación a las cantidades de los excipientes estudiados y puede predecir el 68,23% de la variabilidad. El modelo ajustado no presentó falta de ajuste significativa ($F=1,78$, $p=0,3012$). Se demuestra numéricamente el efecto positivo (disminución de la friabilidad) que producen la lactosa monohidratada y la polivinilpirrolidona, en los signos negativos de los

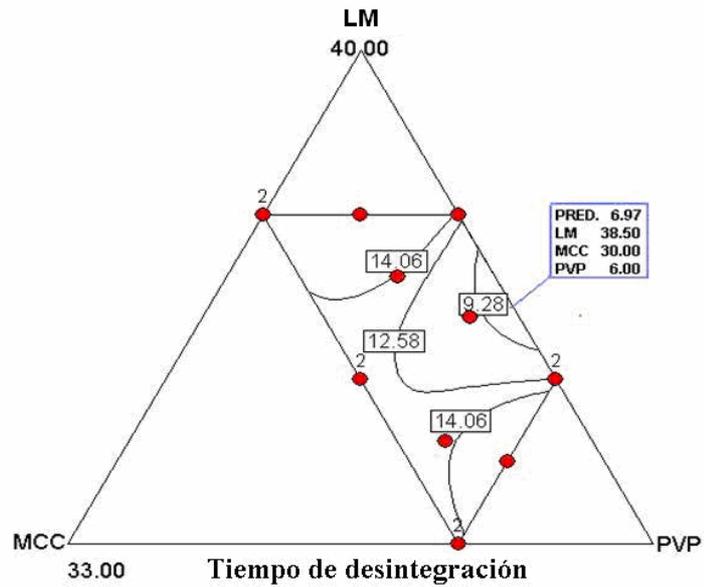


Figura 20. Gráfico de contornos para el tiempo de desintegración.

El recuadro indica el valor predicho (PRED) para el tiempo de desintegración y para cada uno de los excipientes en ese punto.

MCC, celulosa microcristalina; PVP, polivinilpirrolidona, LM lactosa monohidratada

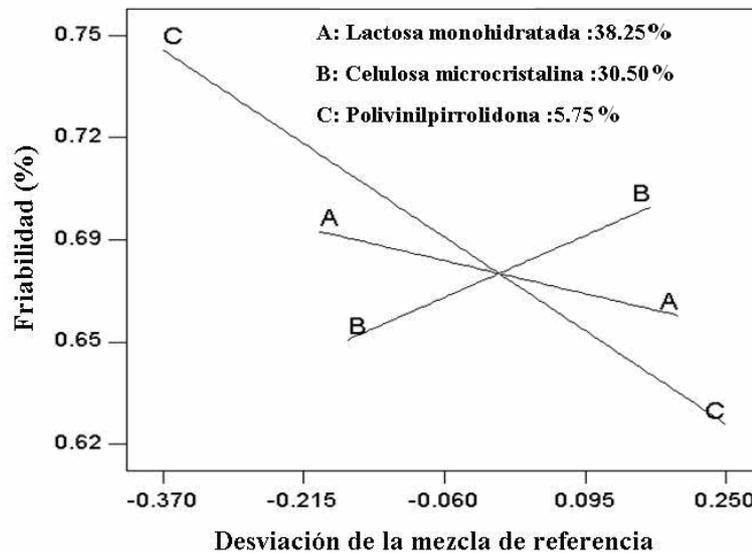


Figura 21. Comportamiento de la friabilidad de las tabletas de *Tamarindus indica* L en función de la variabilidad de cada uno de los excipientes en la formulación.

coeficientes de estos excipientes. La expresión del modelo ajustado para la friabilidad, se muestra a continuación:

$$\text{Friabilidad} = -0,002 \cdot \text{LM} + 0,034 \cdot \text{MCC} - 0,05 \cdot \text{PVP} \quad \text{Ecuación (10)}$$

R^2 Aj. 0,7312; Q^2 = 0,6823; PRESS=0,014

La figura 22 presenta el gráfico de contornos para la friabilidad. Se evidencia que, los menores valores de friabilidad se obtienen cuando las cantidades de lactosa monohidratada y polivinilpirrolidona en la formulación se encuentran entre 38.5-39% y 6.0-6.5% respectivamente. Este comportamiento se debe a que la lactosa monohidratada, normalmente produce tabletas duras y poco friables (Ysimi, 2003; Rowe, 2009; Souza y col., 2009), y a este hecho se suma una mayor cantidad de polivinilpirrolidona en la formulación, lo que facilita la formación de una tableta dura, con partículas fuertemente adheridas a las películas que esta forma, y por ello pierden muy pocas partes del material, lo que trae como consecuencia una baja friabilidad. Otros elementos que coadyuvan a obtener tabletas poco friables son la adecuada humedad residual y la homogénea distribución de los tamaños de partícula del granulado (Souza y col., 2006; Souza y col., 2009), aspectos evidenciados en las tabletas de *Tamarindus indica* L.

III.3.3 Optimización y validación de los resultados

El proceso de optimización de una formulación, utilizando los diseños experimentales, permite maximizar o minimizar las respuestas que mejor representan el resultado que se necesita alcanzar, en función de los modelos obtenidos para cada variable respuesta estudiada en el diseño experimental y dentro de determinados límites o restricciones de la región experimental. La técnica más utilizada en los últimos años para resolver problemas de optimización en Tecnología Farmacéutica es quizás, el método de Myers y Montgomery (Myers y Montgomery, 1995; Montgomery, 2000). Este es conocido como el método de múltiples respuestas o de *Deseabilidad*.

Para la optimización y selección de la mejor formulación de tabletas de *Tamarindus indica* L., se utilizó en esta investigación el método de Myers y Montgomery, el cual

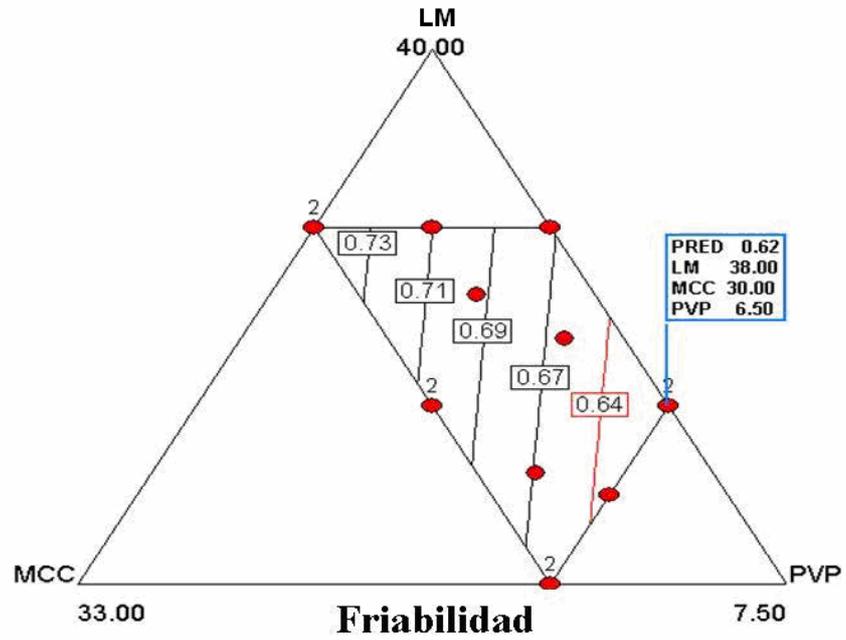


Figura 22. Gráfico de contornos para friabilidad de las tabletas de *T. indica L*

El recuadro indica el valor predicho (PRED) para la friabilidad y para cada uno de los excipientes en ese punto.

MCC celulosa microcristalina PVP, polivinilpirrolidona, LM lactosa monohidratada

permitió reflejar el rango deseable para cada una de las variables respuesta en la formulación. Esta función ha sido utilizada con magníficos resultados en el proceso de optimización de tabletas por otros autores, (Narendra y col., 2005; Fernández y col., 2008).

Para la aplicación de la función de Deseabilidad en este trabajo, se utilizó el software DX 6 (StatEase Co, USA). Se le asignó mayor peso a la disminución del tiempo de desintegración, con una *importancia* de 5, y una menor *importancia* a la disminución de la friabilidad y la maximización de la dureza de las tabletas, a las que se les asignó una *importancia* de 4. Como criterios para los intervalos correspondientes a las cantidades de excipientes utilizados en la función, se tomó el comportamiento de estas tres variables respuestas con relación a las cantidades de excipientes evaluadas en el diseño.

El software aportó una única solución (Figura 23), con un valor de Deseabilidad de 0,809, valor cercano a 1, y por tanto muy próximo a las condiciones deseadas. La solución calculada fue: lactosa monohidratada, 38,13%; celulosa microcristalina, 30,00%; y polivinilpirrolidona, 6,37%.

Con estos resultados, se procedió a la preparación de tres formulaciones de tabletas de ***Tamarindus indica* L**, utilizando la misma metodología empleada anteriormente. Se validó la solución que aportó la función de optimización (Deseabilidad) a través de una comparación entre los valores predichos por la función y los observados en las formulaciones elaboradas con las cantidades de excipientes predichas.

La tabla XVII muestra los valores de tiempo de desintegración, dureza y friabilidad obtenidos una vez evaluada la calidad tecnológica de las tabletas con las cantidades de excipientes aportadas por el modelo de optimización. Puede observarse que para todas las variables, el valor predicho por el modelo se encontró dentro de los límites de confianza observados en la práctica.

Posteriormente, se procedió a evaluar el resto de los parámetros de calidad de las tabletas obtenidas en los tres ensayos adicionales y los valores de cada una de las propiedades se muestran en la tabla XVIII.

El proceso de optimización permitió la obtención de tabletas de ***Tamarindus indica* L**, con una buena dureza, una baja friabilidad y un tiempo de desintegración por

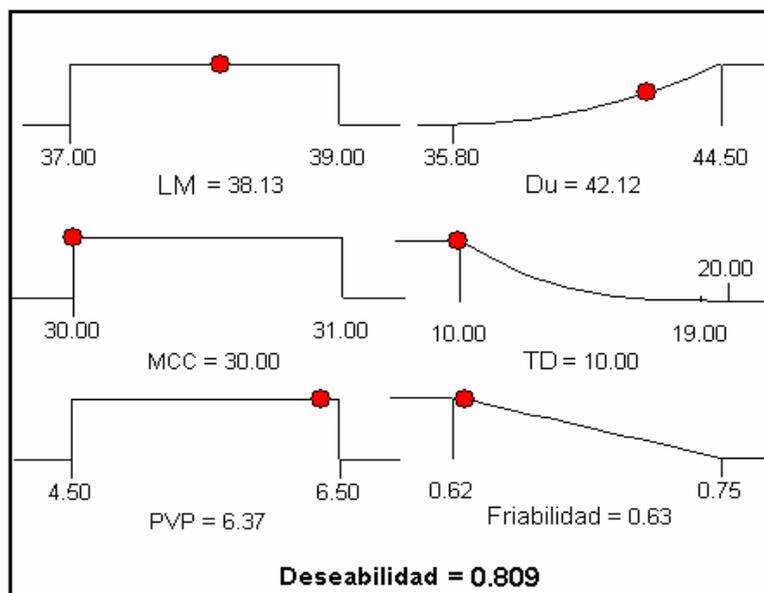


Figura 23. Gráfico de rampas que representa la función Deseabilidad, en el proceso de optimización de las tabletas de *Tamarindus indica L.*

MCC, celulosa microcristalina; PVP, polivinilpirrolidona, LM, lactosa monohidratada; Du, dureza; TD, tiempo de desintegración.

Tabla XVII. Comparación de los valores predichos por el modelo de optimización, con los valores observados en la preparación de las tabletas de *Tamarindus indica L.*, con la formulación aportada por el modelo optimizado

Propiedad	Predicho	Observado	LI	LS
Tiempo de desintegración (min.)	10.0	9.83 ± 1.04	8.79	10.87
Dureza (N)	42.12	43.17 ± 1.87	41.3	45.04
Friabilidad (%)	0.63	0.72 ± 0.11	0.61	0.83

LI, límite inferior y LS, límite superior de la observación (n=3)

Tabla XVIII. Propiedades tecnológicas de la formulación de tabletas de *Tamarindus indica* L optimizada, con la desviación estándar

Propiedad	UM	Valor (\pm DE)
Masa promedio	ug	597.23 \pm 4.73
Altura de la tableta	mm	4.92 \pm 0.04
Dureza	Kg/F	43.17 \pm 1.87
Friabilidad	%	0.72 \pm 0.11
Uniformidad de contenido	-	Cumple
Tiempo de desintegración	Min.	10.00 \pm 1.00
Cantidad de polifenoles x tableta	%	3.44 \pm 0.54
Humedad residual	%	2.35 \pm 0.08

Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar (DE), (n=3)

debajo de 10 minutos, cumpliendo la formulación con los requerimientos que para esta forma farmacéutica, se establecen en los compendios oficiales (USP, 2007; BP, 2010).

III.3.4 Estudios de estabilidad en estante

Previo a los ensayos de estabilidad en estante, se realizaron estudios de estabilidad acelerada a las tabletas de ***Tamarindus indica* L.** En este estudio se identificó la influencia negativa de la luz, las temperaturas mayores de 42.5 °C y de la humedad relativa en las propiedades tecnológicas y químicas de las tabletas. Se estableció además, que el mejor envase para el almacenamiento y conservación de las tabletas, es el de cloruro de polivinilo (PVC) de alta densidad, con tapa inviolable, ya que protege a las tabletas de la influencia de la luz y de la humedad.

Los resultados de los estudios de estabilidad en estante realizados a las tabletas de ***Tamarindus indica* L.**, se muestran en la tabla XIX. En las condiciones de envasado y conservación utilizadas, las tabletas mantuvieron las propiedades organolépticas, así como las propiedades tecnológicas a lo largo de los dos años de estudio.

La desviación estándar de la dureza de las tabletas a los dos años de estudio, incluyó el valor de dureza a tiempo 0, y la friabilidad se mantuvo durante todo el tiempo por debajo del 0,7%, elemento que concuerda con la literatura especializada, que exige que sea menor de 1% (USP, 2007; BP, 2010).

Se ha informado que la variación de la altura de las tabletas no debe ser superior a 5% de la altura establecida (altura a tiempo 0) (Lieberman y Lachman, 1981). La altura de las tabletas de ***Tamarindus indica* L.** mostró una tendencia a incrementarse a lo largo del estudio. Hasta un tiempo de 18 meses, la altura promedio se mantuvo por debajo del 5%. A los 21 meses el incremento llegó hasta un 5.88% y a los 24 meses a un 6.6%.

Este aumento podría estar relacionado con la absorción de humedad por las tabletas (Yoshioka y Stella, 2002) que fue de un 0,22% y produce un ligero hinchamiento de la estructura de la tableta, provocando el aumento de la altura.

Este parámetro deberá estandarizarse para la producción de tabletas a nivel industrial, debiéndose realizar el estudio de los perfiles de compresión, para

Tabla XIX. Resultados de los estudios de estabilidad en estante de las tabletas de *Tamarindus indica* L

Tiempo	Dureza (Kg/f)	Masa promedio (mg)	Altura (mm)	Tiempo de desintegración (s)	Friabilidad (%)	Humedad residual (%)	Fenoles totales (%)
0	5.46 (0.11)	599.98 (16.31)	5.61 (0.15)	579 (29)	0.57 (0.10)	2.21 (0.09)	3.37 (0.38)
3	5.49 (0.21)	600.65 (14.23)	5.62 (0.12)	595 (33)	0.56 (0.14)	2.25 (0.04)	3.34 (0.21)
6	5.35 (0.14)	601.44 (15.41)	5.67 (0.09)	560 (41)	0.65 (0.19)	2.27 (0.08)	3.30 (0.14)
9	5.33 (0.35)	601.94 (11.58)	5.69 (0.19)	541 (29)	0.64 (0.17)	2.29 (0.11)	3.25 (0.09)
12	5.30 (0.33)	602.14 (21.10)	5.72 (0.17)	525 (23)	0.61 (0.14)	2.33 (0.11)	3.22 (0.16)
15	5.30 (0.41)	602.58 (10.22)	5.79 (0.17)	512 (37)	0.65 (0.11)	2.45 (0.09)	3.19 (0.19)
18	5.27 (0.29)	603.31 (14.75)	5.88 (0.11)	501 (41)	0.72 (0.12)	2.47 (0.15)	3.13 (0.19)
21	5.26 (0.23)	610.22 (19.54)	5.94 (0.13)	495 (42)	0.75 (0.15)	2.51 (0.11)	3.06 (0.12)
24	5.24 (0.30)	611.58 (26.33)	5.98 (0.09)	494 (47)	0.76 (0.21)	2.53 (0.14)	3.01 (0.21)

Los resultados se expresan como la media de los parámetros informados \pm la desviación estándar (DE), (n=3)

seleccionar la presión de compactación a utilizar y establecer la altura adecuada, como parámetro para el control de la calidad.

El tiempo de desintegración se mantuvo por debajo de 10 min en todo el período estudiado. A los dos años, este parámetro fue menor que el determinado a tiempo 0. Esto pudiera estar relacionado con el hecho de que, al aumentar la humedad residual y la altura de las tabletas, los poros se ensanchan, facilitando la penetración de los líquidos y el hinchamiento de la croscarmelosa sódica, incidiendo en que las tabletas desintegren con mayor facilidad.

La masa promedio de las tabletas aumentó en 11.82 mg en los dos años de ensayo. No obstante el valor medio de este parámetro a los dos años de estudio, quedó incluido en el intervalo de confianza el valor medio a tiempo 0, por lo que no hay diferencia estadística significativa entre los valores de la masa promedio en ambos tiempos (Tabla XIX). Por otra parte, las diferencias en la masa promedio de las tabletas de *Tamarindus indica* L, están comprendidas dentro de la variabilidad permitida para tabletas de una masa de 600 mg, que es de ± 30 mg (USP, 2007; BP, 2010).

Los resultados del *análisis microbiológico* realizado a las tabletas de tamarindo durante los dos años, se presentan en la tabla XX. La estabilidad microbiológica de las mismas se mantuvo a lo largo del estudio. Se ha informado en la literatura que los extractos de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L, poseen buenas propiedades como agente antimicrobiano (Escalona y col., 2010^a). Durante este estudio se ha evidenciado que la calidad microbiológica de las tabletas que contienen un 20% como sólidos totales (120mg) de EBT, no se altera durante dos años. En el anexo I se presentan los reportes de los análisis de estabilidad microbiológica en cada tiempo del estudio.

La *cantidad de fenoles* totales en la formulación a lo largo de los dos años se mantuvo entre 3.01% y 3.37%. No se encontró diferencias estadísticas significativas entre los valores de polifenoles a tiempo cero y pasados los dos años de estudio ($t = -1,81748$ y $p = 0,14329$). La prueba de Kolmogorov-Smirnov demostró la normalidad de los datos todos los tiempos evaluados.

Tabla XX. Resultados del estudio de estabilidad microbiológica en estante de las tabletas de *Tamarindus indica* L durante dos años. Los límites indicados son los recomendados por la Farmacopea Británica (2010).

	Límites	Tiempo (años)		
		0	1	2
Conteo de : Microorganismos		0	1	2
Bacteria	< 10 ³ ufc / g	<10	<10	<10
Hongos	<10 ² ufc / g	<10	<10	<10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia			
<i>Enterobacterias</i>	Ausencia	Total ausencia dos años		
<i>Candida albicans</i>	Ausencia			

De manera general no basta con la evaluación de la estabilidad química de las tabletas de *Tamarindus indica* L. utilizando los polifenoles como marcador químico (CECMED, Regulación 16, Anexo 3; 2006). Por esta razón para establecer un criterio de estabilidad química, que abarque el extracto vegetal en su totalidad, en este trabajo se desarrolló un estudio por cromatografía de capa delgada, que en este momento se ha realizado hasta 9 meses.

Los cromatogramas obtenidos durante este estudio se presentan en la figura 24. Se verificó en las condiciones cromatográficas empleadas, para los tres lotes de tabletas, en cada uno de los tiempos evaluados, que siempre aparecen tres manchas a los mismos valores de Rf: 0.63, 0.71 y 0.85. Esto indica que en las condiciones de almacenamiento y conservación en las que se ha realizado el estudio, no ha ocurrido ningún cambio que indique inestabilidad química, que pueda reflejarse en cambios en los cromatogramas.

De manera general, la estabilidad de un medicamento, debe estimarse integrando todos los criterios obtenidos en los estudios que ello comprende. Con los resultados obtenidos hasta este momento, debe considerarse que la estabilidad de las tabletas de *Tamarindus indica* L. se mantiene intacta durante 9 meses.

III.4 Evaluación toxicológica de las tabletas de *Tamarindus indica* L

III.4.1 Evaluación de la toxicidad aguda oral

Se plantea que toda sustancia tóxica produce alteraciones anatomofisiológicas. Estas se manifiestan en modificaciones en el cuadro clínico general y dependen de la severidad y extensión de la lesión, así como de los sistemas de órganos involucrados, duración de la exposición, cantidad total de la sustancia en sangre, edad y salud general del animal (Hayes, 1984; OECD 425, 2008).

La evaluación de la toxicidad aguda oral de cualquier sustancia, constituye un paso inicial imprescindible para el establecimiento de los regímenes de dosificación y constituye la base para la clasificación de las mismas dentro de las Clases de Toxicidad Aguda (OECD 423, 2001).

En la determinación de la toxicidad aguda oral de una sustancia se buscan manifestaciones clínicas que evidencien daños asociados a lesiones en órganos y

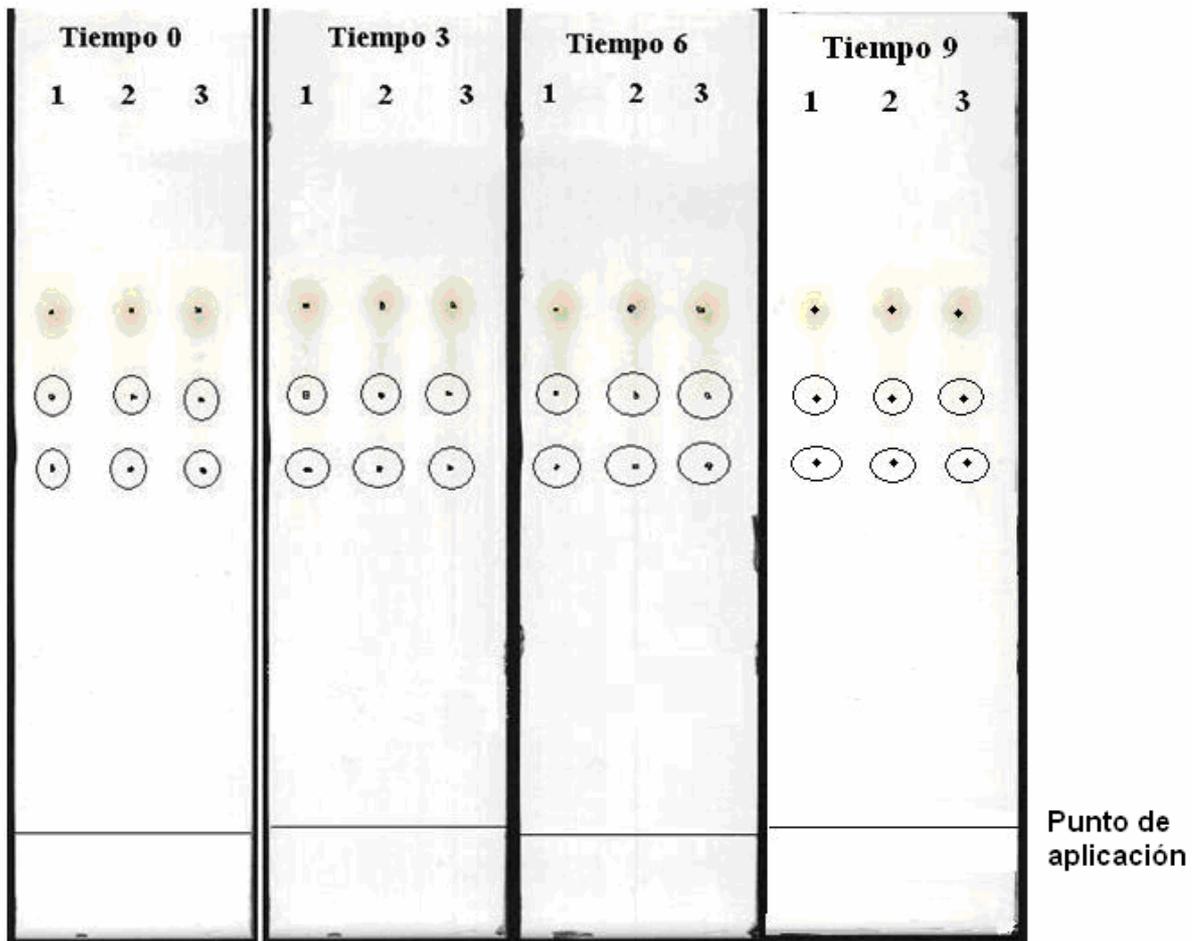


Figura 24. Cromatogramas de tres lotes de tabletas de *Tamarindus indica* L, evaluados durante 9 meses como parte del estudio de estabilidad en estante.

Soporte sílica gel GF₂₅₄, sistema de solventes: n-butanol: ácido acético: 2-propanol (4.2:4), tiempo de corrida 2.5 horas, revelador UV, 254 nm.

sistemas de órganos, que traen por resultado alteraciones en sus funciones (Hayes, 1994).

III.4.1.1 Signos clínicos

En las observaciones clínicas realizadas a los biomodelos experimentales del grupo control y del grupo experimental tratado con las tabletas de *Tamarindus indica* L, no se observaron signos clínicos que pudieran asociarse a efectos tóxicos sistémicos. No se manifestaron cambios en la piel y el pelaje, ni en la coloración y apariencia de los ojos y mucosas. La actividad somato-motora y el comportamiento de los animales fue el normal para la especie. El ensayo concluyó con un 100% de supervivencia en ambos grupos.

III.4.1.2 Comportamiento del peso corporal

Según la literatura especializada (Gad, 1994), el peso corporal es el parámetro más sensible para indicar un efecto tóxico sistémico. Se plantea que posee una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos químicos de baja toxicidad (Mosberg, 1989), y como resultado de la administración de tales productos, el peso corporal de los biomodelos experimentales pueda disminuir aceleradamente en un período muy corto (*Harvard Medical Asea*, 1999).

El análisis del peso corporal no arrojó ninguna evidencia que pudiera asociarse a toxicidad. En la figura 25 se muestra el comportamiento del peso corporal de ambos grupos experimentales durante el estudio. El incremento característico del peso corporal se mantuvo durante todo el período de observación aún con la aplicación de la dosis límite de este producto.

Se comprobó que el peso de los animales estuvo en el intervalo de valores normales establecido para este tipo de estudio (ISO 1093/10, 2002; Draize y col., 1994, Días y col., 2008). No se encontraron diferencias significativas entre las medias del peso corporal de ambos grupos en cada uno de los tiempos.

III.4.1.3 Estudio anatomopatológico

En la observación macroscópica realizada durante la necropsia, no se encontraron alteraciones de valor diagnóstico en ninguno de los órganos inspeccionados. Los

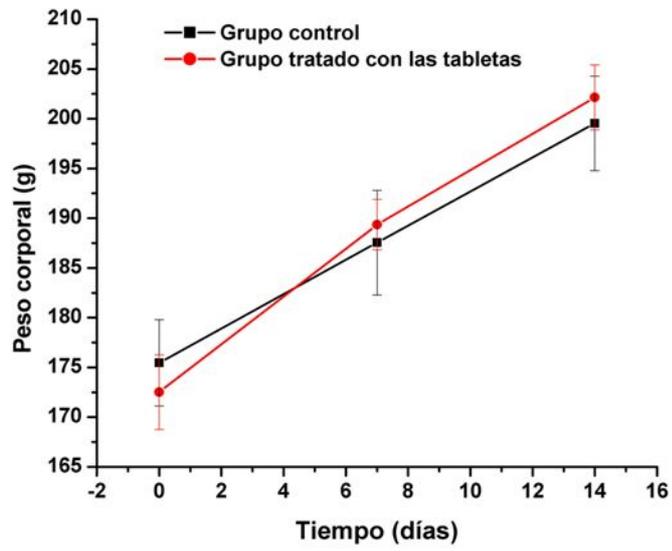


Figura 25. Ganancia de peso corporal en los biomodelos experimentales (ratas Sprague Dawley) durante la evaluación de la toxicidad aguda oral por el método de las Clases de Toxicidad Aguda (OECD 423, 2001)

estudios histológicos no mostraron alteraciones en la citoarquitectura de los tejidos de los órganos estudiados, que pudieran atribuirse a procesos tóxicos.

Como no hubo signos clínicos que evidenciaran toxicidad, ni muerte en los biomodelos experimentales, con la dosis límite que establece la OECD 423, que se corresponde con una $DL_{50} \geq 2000$ mg/kg, no fue necesario pasar a probar niveles de dosis inferiores. Las tabletas de ***Tamarindus indica* L** “no clasifican” como sustancia tóxica aguda por la vía oral, en el modelo animal y las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación, según la escala de toxicidad recomendada en la norma de referencia.

La ausencia de signos clínicos, el incremento del peso corporal de los biomodelos experimentales durante el estudio, así como los resultados del estudio anatomopatológico, son resultados que confirman que las tabletas de tamarindo no producen toxicidad aguda oral. Este hecho es una de las evidencias que validan la utilización durante siglos de las hojas de esta planta por la población de diversos países, sin que se haya observado o informado hasta el presente signo de toxicidad asociado al uso etnobotánico de la misma (El-Siddig, 2007).

III.4.2 Irritabilidad de la mucosa oral

La evaluación de la irritabilidad se realizó teniendo en cuenta los parámetros establecidos en la norma ISO 10993-10 y se determinó el índice de irritación, según los criterios planteados en esta norma. El ensayo de irritabilidad oral debe solamente considerarse para los materiales con contacto previsto con el tejido oral y solo si los datos de seguridad no pueden obtenerse por ningún otro medio (ISO 10993-10, 2002).

III.4.2.1 Comportamiento del peso corporal

El comportamiento del peso corporal de los dos grupos ensayados se muestra en la figura 26. Se puede apreciar que se mantuvo un incremento normal del peso corporal de los animales, de acuerdo con la especie utilizada. Este hecho indica que la irritación producida por las tabletas de ***Tamarindus indica* L**, no impidió a los biomodelos experimentales alimentarse y beber agua adecuadamente, factores determinantes para que ocurra la ganancia de peso corporal de los animales. No se

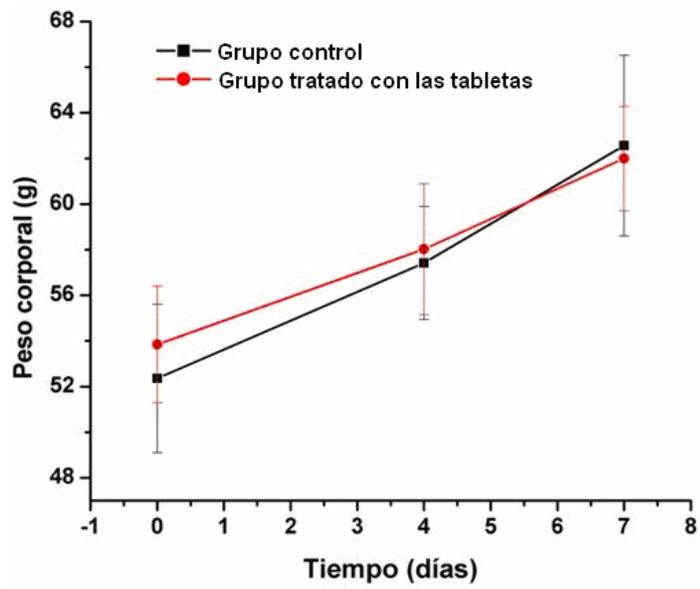


Figura 26. Ganancia de peso corporal de los biomodelos experimentales (Hámster Sirio Dorado), durante la evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral (ISO 10-993-10, 2002)

encontraron diferencias significativas en el incremento del peso corporal entre ambos grupos experimentales. Se verificó la normalidad de la data obtenida en cada tiempo de experimentación, encontrando siempre p-valores del test de Kolmogorov-Smirnov mayores de 0,05. En cada tiempo de evaluación la prueba t arrojó p-valores mayores 0,05 (Montgomery, 2000). Este resultado coincide con el de otros autores que han evaluado el potencial irritante de sustancias que van a ser utilizadas por vía oral (Días y col., 2008).

III.4.2.2 Evaluación histopatológica

La evaluación macroscópica de la mucosa oral de los biomodelos no mostró signos aparentes que indicaran algún tipo de lesión por irritación. Sin embargo, microscópicamente se encontraron reacciones inflamatorias a nivel de la mucosa oral. La evaluación proporcionó un índice de Irritación de 5, que clasifica como una sustancia de irritabilidad media, pero en el límite inferior de esta clasificación (ISO/DIS 10993-10, 2002).

Teniendo en cuenta la presencia de ácidos orgánicos como el cítrico (1.3 %), tartárico (1%) y ascórbico (2%) (El-Siddig, 2007) y de ácidos fenólicos (Escalona y col., 2010^b) en el EBT, este resultado es lógico. Sin embargo, este hecho no resulta en modo alguno invalidante para el uso de estas tabletas por vía oral. El índice de Irritación de 5, que clasifica como irritabilidad media, está en el límite inferior de la clasificación y autoriza la sustancia para su uso en humanos según la literatura especializada (Repetto, 1988; ISO 1093/10, 2002). Por otra parte, las tabletas de ***Tamarindus indica* L** solo estarán en contacto con la mucosa oral unos segundos, en el momento que el paciente la coloca en la lengua, justo antes de beber el agua y no 5 minutos cada hora, durante 4 horas consecutivas, como sugiere la literatura para este ensayo (ISO 1093/10, 2002). Se puede destacar además, que sustancias irritantes, como la vitamina C, se utilizan en tabletas para chupar, sin peligro potencial para las mucosas.

Con estos elementos se puede asegurar que, desde el punto de vista del ensayo de irritabilidad, la utilización las tabletas de ***Tamarindus indica* L** en pacientes, es segura, pues las tabletas son una forma farmacéutica sólida, que no desintegran en

la boca, paso que sería absolutamente necesario para que pudieran causar alguna irritación en la mucosa oral.

III.5 Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora

III.5.1 Observaciones clínicas

La actividad motora de los biomodelos experimentales se mantuvo normal durante el tiempo de estudio en todos los grupos ensayados. La piel y el pelaje conservaron la suavidad y el brillo. Las mucosas mostraron una coloración rosada y una apariencia húmeda. Los ojos mantuvieron su coloración y una apariencia húmeda a lo largo del estudio.

Se observó piloerección en todos los animales a los que se les administró el tetracloruro de carbono (del Grupo II al Grupo V). Esta reacción desapareció entre el cuarto y quinto día de ensayo. El consumo de agua y de alimento de los modelos animales utilizados resultó normal durante los 7 días de ensayo. El peso corporal aumentó según lo esperado para la especie, en todos los grupos experimentales. El ensayo concluyó con un 100% de supervivencia en todos los grupos estudiados.

III.5.2 Peso relativo del hígado

El peso relativo del hígado, es un indicador estandarizado del comportamiento de este órgano, en animales de experimentación sometidos a tratamientos con sustancias tóxicas que producen daño hepático, como el mercurio, paracetamol, tetracloruro de carbono y otros tóxicos químicos (Brend, 1993; Surendra y Bodakhe, 2007; Girish y col., 2009). El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas entre las medias de los cinco grupos experimentales ($F=15.81$, $p=0.0000$).

En el Grupo tratado con tetracloruro de carbono se observó un aumento de la relación peso relativo del hígado que fue diferente estadísticamente al resto de los grupos (Figura 27). Este hecho ha sido referido en la evaluación de la actividad antioxidante de algunas sustancias hepatoprotectoras, en este modelo (Girish y col., 2009; Heba y col, 2011).

El peso relativo del hígado en el Grupo Silimarina y el Grupo Control no fueron estadísticamente diferentes entre si. El aumento del peso y del tamaño del hígado en

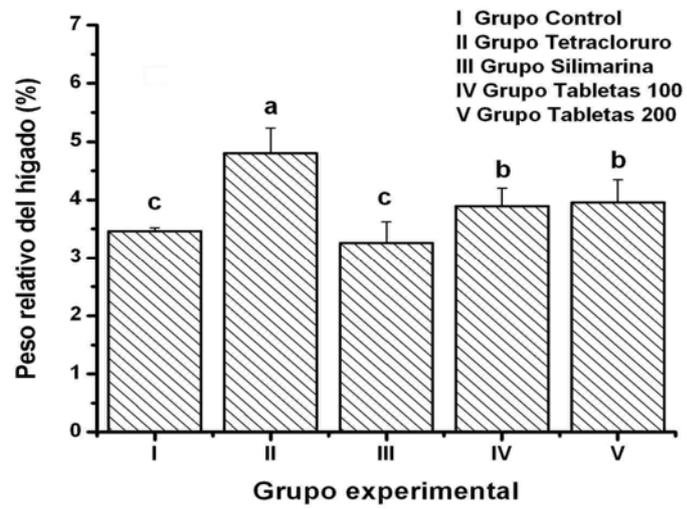


Figura 27. Comportamiento del peso relativo del hígado de los biomodelos experimentales en los grupos estudiados durante la evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de las tabletas de tamarindo.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

biomodelos experimentales intoxicados con tetracloruro de carbono, aparece reportado en muchos informes de investigación (Yossef y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011; Heba y col., 2011). Sin embargo, en los grupos tratados con las tabletas en ambas dosis se observó que el peso relativo del hígado fue significativamente diferente y menor, que el grupo que no recibió tratamiento hepatoprotector (Grupo Tetracloruro). Los grupos Tabletas 100 y Tabletas 200, no mostraron diferencias estadísticas significativas.

III.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante

III.5.3.1 Determinación de malonildialdehído

Las reacciones de propagación asociadas a la peroxidación lipídica producen, entre otros compuestos, el malonildialdehído, que es el indicador más utilizado en la literatura para evaluar la peroxidación lipídica (Takate y col., 2010; Lewis y Mohanty, 2010; Manjunatha y col., 2011; Heba y col., 2011, Saha y col., 2011). La figura 28 presenta las concentraciones de malonildialdehído en tejido hepático en los grupos estudiados.

Se observó una elevada concentración de malonildialdehído como respuesta a la intoxicación de los animales de experimentación del Grupo Tetracloruro, lo que ha sido referido en numerosos informes que han utilizado este modelo de intoxicación hepática para evaluar potencialidad antioxidante (Gupta y col., 2006; Patel y Shah, 2009; Heba y col., 2011). El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas entre las medias de los 5 grupos experimentales ($F=111,18$; $p=0,0000$). No se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los grupos Silimarina, y los grupos Tabletas 100 y Tabletas 200 ($p<0.05$). El grupo Control y el grupo Tetracloruro fueron diferentes entre sí, y ambos fueron distintos del resto de los tratamientos. El grupo Tabletas 100 fue diferente estadísticamente del Grupo Control. Las tabletas de tamarindo en los dos niveles de dosis estudiados, disminuyeron significativamente la producción de malonildialdehído en el hígado de los biomodelos experimentales utilizados. Este hecho evidencia una actividad inhibitoria de la peroxidación lipídica, que no fue diferente estadísticamente, de la que produce la Silimarina, administrada en la dosis de 150 mg/kg de peso.

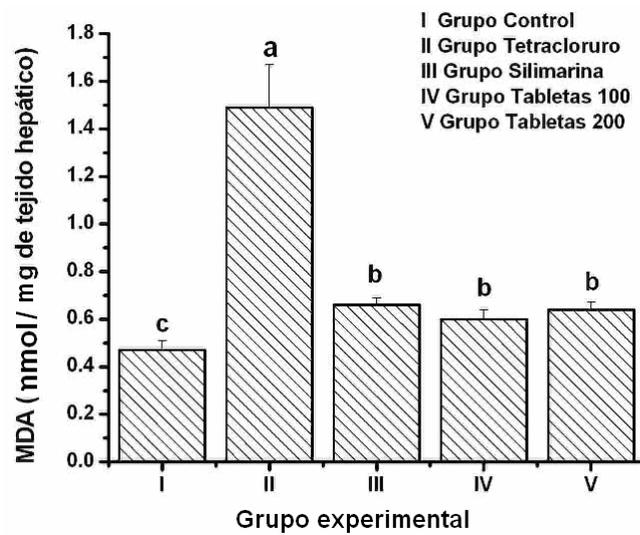


Figura 28. Comportamiento de la producción de malondialdehído en el hígado de los biomodelos experimentales, durante la evaluación de la peroxidación lipídica. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

III.5.3.2 Superóxido dismutasa

La producción del anión superóxido es un proceso natural que ocurre asociado a la respiración de los organismos aerobios. Las enzimas superóxido dismutasa, son un grupo de cuatro metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Estas enzimas juegan un papel esencial en la regulación del mecanismo redox celular (Martin y col., 1984; Lynch y Kuramitsu, 2000; CCC, 2010; Takate y col., 2010; Heba y col., 2011) y por tanto, cualquier disminución de la actividad de este grupo de enzimas se asocia a un desbalance redox celular.

La administración del tetracloruro de carbono produjo en el Grupo Tetracloruro una sensible disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, comparada con el Grupo Control, el Grupo Silimarina y los grupos tratados con las tabletas de tamarindo en ambas dosis (figura 29). Este resultado se corresponde con numerosos informes de la literatura, donde se ha utilizado este modelo de intoxicación hepática (Patel y Shah, 2009; Amin and Ghoneim, 2009; Heba y col., 2011).

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las medias de los 5 grupos experimentales ($F= 80,55$, $p= 0,0000$). En este sentido el Grupo Tetracloruro tuvo un valor medio menor y diferente al resto de los grupos experimentales.

Los Grupos Silimarina y Tabletadas 100 mostraron niveles similares en la actividad de esta enzima. De todos los grupos estudiados, el tratado con las tabletas de ***Tamarindus indica* L.** en la dosis de 200 mg/kg de peso (Grupo Tabletadas 200), fue el que presentó un nivel superior de actividad de esta enzima, similar al grupo control. Otros investigadores han referido resultados similares en estudios de la actividad antioxidante de extractos de plantas medicinales en hígado (Lewis y Mohanty, 2010; Heba y col., 2011), y en otros órganos (Abdel-Wahhab y col., 2008; Betancourt y col., 2011; Marin y col., 2011).

Se ha demostrado que existen 4 tipos de enzimas superóxido dismutasa que son metalodependientes, que actúan en diferentes partes de la célula: Fe-SOD, Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y Ni-SOD (Lynch y Kuramitsu, 2000), y estos cinco metales están presentes en pequeñas cantidades en el principio activo de las tabletas de tamarindo, lo que pudiera contribuir razonablemente con la actividad de estas

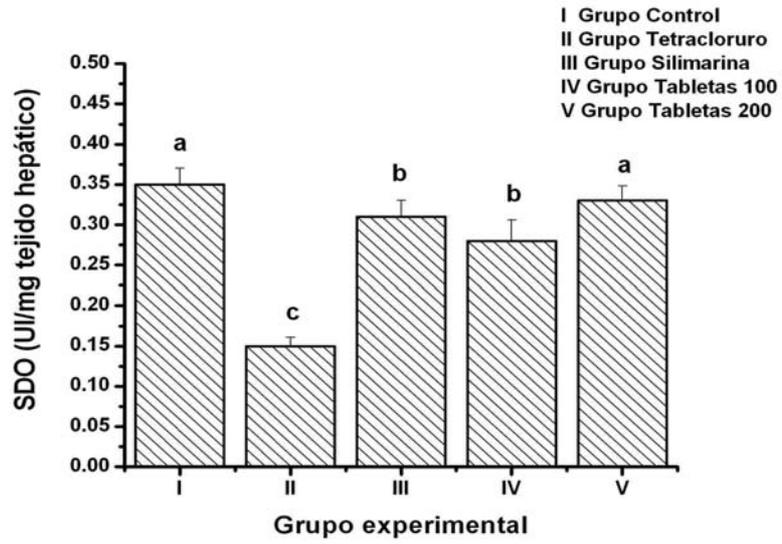


Figura 29. Comportamiento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa en el hígado de los biomodelos experimentales, durante la evaluación de la actividad antioxidante.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

enzimas, que actúan de forma coordinada con la catalasa, en el mantenimiento del equilibrio redox celular.

De este modo, las tabletas de *Tamarindus indica* L., en las condiciones experimentales, el modelo animal, y los niveles de dosis utilizados en la investigación, poseen un efecto antioxidante, capaz de modular la actividad de este grupo de metaloenzimas, para mantener el equilibrio entre la producción del anión superóxido y sus productos de dismutación (peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular), que es uno de los fundamentos del sistema enzimático endógeno de balance redox celular.

III.5.3.3 Efecto en los niveles de catalasa

Los niveles de catalasa en el hígado de los biomodelos se ven reducidos drásticamente por la acción hepatotóxica del tetracloruro de carbono (Figura 30), hecho que ha sido referido con anterioridad. (Takate y col., 2010; Heba y col., 2011).

La actividad de la enzima catalasa en el Grupo Tetracloruro fue menor y diferente estadísticamente, del resto de los grupos experimentales. En el grupo Tabletas 100 la actividad de la catalasa se elevó por encima del nivel de los valores observados en los grupos Control, Silimarina y Tabletas 200. Sin embargo, en el grupo Tabletas 100, se observó que se produjo un incremento de la actividad de la Catalasa superior al resto de los grupos experimentales, incluido el Grupo Control.

El análisis de varianza realizado mostró diferencias estadísticas significativas entre las medias de todos los grupos ($F= 166,57$, $p < 0,0000$). El efecto observado en el Grupo Silimarina no fue diferente estadísticamente, del efecto observado en el Grupo Tabletas 200.

El comportamiento observado en la actividad de esta enzima es consistente con los referidos por otros investigadores que han evaluado la actividad enzimática en el modelo de intoxicación hepático con tetracloruro de carbono (Lewis y Mohanty, 2010; Heba y col., 2011), y en otros modelos de intoxicación, como la inducida con paracetamol (Betancourt y col., 2011; Marin y col., 2011).

El aumento de la actividad de esta enzima, a niveles superiores al Grupo Control, pudiera estar relacionado, con que la actividad enzimática de la superóxido

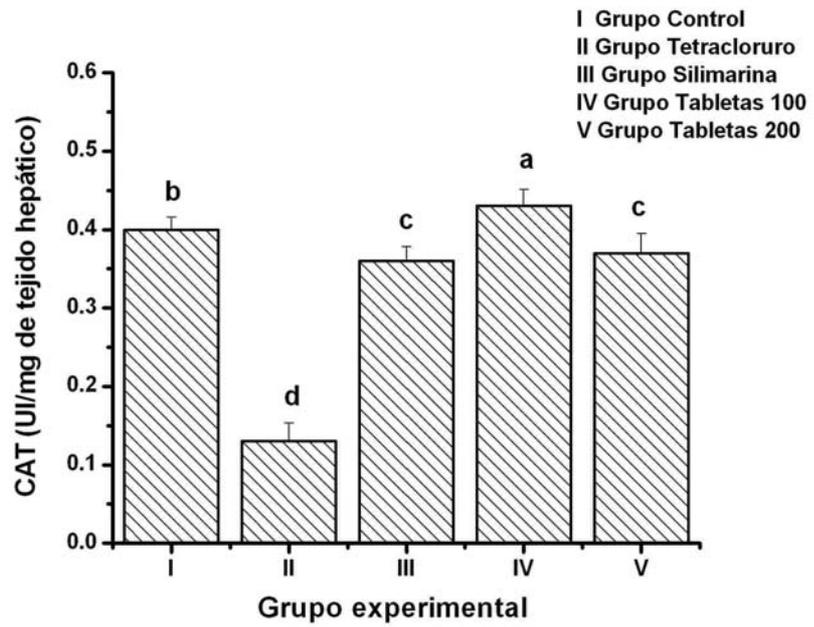


Figura 30. Comportamiento de los niveles de catalasa en los biomodelos experimentales, en la evaluación de la actividad antioxidante.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

dismutasa y de la catalasa se ven favorecida por la presencia de las vitaminas C y E y el glutatión (Martin y col., 1985). Estas vitaminas forman parte del sistema antioxidante no enzimático exógeno, formado por numerosos micronutrientes como el selenio, el cobre, el cinc, el níquel y el manganeso (Sies y Stahl, 1995).

III.5.3.4 Glutatión reducido

El glutatión reducido (GSH) actúa conjuntamente con las vitaminas y los micronutrientes en la defensa antioxidante (Martin y col., 1984; Boots y col., 2008). Por ello, un estrés oxidativo intenso, como el asociado a la intoxicación con tetracloruro de carbono y otros tóxicos, causa depleción de GSH en la célula (De Leve y Kaplowitz, 1991; Fernández-Checa y col., 1992).

La cantidad de GSH en el Grupo Tetracloruro disminuyó sustancialmente si se compara con los demás grupos experimentales (Figura 31). Este resultado concuerda con los informes de distintos autores, que han determinado la concentración de este tripéptido, para estimar la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, que son las principales enzimas que intervienen en el balance redox del GSH (Takate y col., 2010; Lewis y Mohanty, 2010; Heba y col., 2011; Manjunatha y col., 2011).

El análisis de varianza efectuado para esta variable, mostró que existen diferencias significativas entre las medias de todos los grupos ($F= 66,54$, $p= 0,0000$). En el Grupo Tetracloruro, la concentración de GSH fue menor y estadísticamente diferente, que del resto de los grupos experimentales. No existen diferencias estadísticas significativas entre los Grupos Control y Tabletas 200, y la concentración de GSH en estos fue menor que en los grupos Silimarina y Tabletas 100 ($p<0.005$). De las dos dosis de tabletas evaluadas, la dosis de 100 mg/kg (Tabletas 100) fue donde se apreciaron concentraciones superiores de GSH.

La actividad antioxidante del GSH, se produce en presencia de una GSH-peroxidasa selenio-dependiente, que reduce los peróxidos generados en la peroxidación lipídica, oxidándose a GSSG (glutatión oxidado). El GSH es nuevamente reducido a GSH por la acción de la GSSG-reductasa, a expensas del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH), formando así un ciclo redox. (Martin y col., 1984).

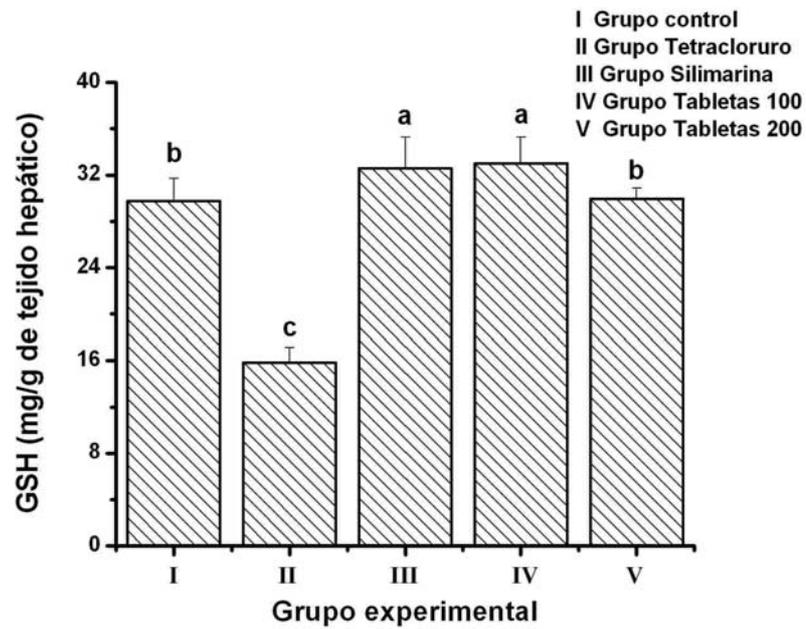


Figura 31. Comportamiento de los niveles de glutatión en los biomodelos experimentales, en el ensayo de la actividad antioxidante de las tabletas de tamarindo.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

Las tabletas de *Tamarindus indica* L contienen cierta cantidad de selenio, que pudiera activar a la GSH-peroxidasa selenio-dependiente, y de este modo, potenciar el ciclo redox del GSH. Esto constituye un elemento adicional en el sistema de defensa antioxidante de la célula, en virtud del restablecimiento el balance redox producido por el tetracloruro de carbono.

III.5.3.5 Sinergia en la actividad antioxidante de las tabletas de tamarindo

A lo largo de la discusión de la actividad antioxidante que ejercen las tabletas de *Tamarindus indica* L, reflejado en el análisis del comportamiento de las cuatro variables estudiadas, se ha establecido que varios de los grupos de metabolitos presentes en el extracto blando de las hojas de *Tamarindus indica* L (fitocomplejo íntegro), contribuyen de manera diversa e importante, a la actividad antioxidante observada.

Estos resultados indican, que la idea de que sólo las fracciones polifenólicas y flavonólicas de estos extractos, sean las únicas responsables del efecto antioxidante (Escalona y col., 1995, Dehesa y col., 1995) no es acertada, y sugieren que ocurre un sinergismo entre los efectos antioxidantes producidos por diferentes tipos de metabolitos presentes en el EBT. Este sinergismo sería la explicación más plausible de la actividad antioxidante observada.

Entre los principales metabolitos que podrían sinergizar la actividad antioxidante de los extractos de *Tamarindus indica* L, y en particular de las tabletas, se encuentran los flavonoides orientina, isoorientina, vitexina y la isovitexina (Pulido y col., 2000; Martínez y col., 2002; Linden, 2008; Dehesa, 2006; Sreelatha y col., 2009; Amin y Ghoneim, 2009; Escalona, 2011^b); ácidos orgánicos como el tartárico, cítrico y málico (León y col., 2005, Omar y col., 2009); ácidos grasos como el palmítico y el oleico (Benkendorff y col., 2005; Won y col., 2007; Stenz y col., 2008; Liolios, 2009; Maznah y col., 2010); vitaminas del complejo B, vitamina C y E (SCSEDR, 2000; León y col., 2005, El Siddig, 2007); microelementos como el selenio (Logercio y Federico, 2003; Newairy y col., 2007), el cobre (SCSEDR, 2000, Mira y col., 2002); los ácidos cafeico y ferúlico (Nagaoka y col., 2003; Zhai y col., 2007; Yeon y col., 2011) y otros metabolitos como los triterpenos, entre los que se encuentran la lupanona y el lupeol. Estos triterpenos además de poseer actividad secuestradora de

radicales libres (Takeoka y Dao, 2003; Lee y col., 2007), han sido asociados con la inhibición de la actividad de deshalogenación del CCl_4 , que producen los citocromos, especialmente la isoforma CYP2E1. Esto evita la formación del radical triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$), que es el que desencadena la peroxidación lipídica (Koop, 1992; Zangar y col., 2000).

Por otra parte, en una investigación con extracto fluido de *Tamarindus indica* L, se demostró “*in vitro*” que la actividad antioxidante del extracto total, o sea del fitocomplejo presente en el extracto de las hojas, resultó siempre mayor que la de sus fracciones aisladas (Escalona, 2011^a).

Este hecho fundamenta científicamente las aplicaciones de los extractos de las hojas de *Tamarindus indica* L y de las formas farmacéuticas preparadas con ellos, como alternativas terapéuticas con potencialidad para el tratamiento de algunas de las enfermedades que cursan con estrés oxidativo, como son las hepatitis, cirrosis hepática, hígado graso, diabetes mellitus, polineuritis, entre otras.

III.5.4 Evaluación de la actividad hepatoprotectora

III.5.4.1 Transaminasas o aminotransferasas

El análisis de varianza realizado a los datos de los niveles de actividad de la enzima *alanina aminotransferasa*, mostró diferencias estadísticas significativas entre las medias de todos los grupos estudiados ($F= 1343,47$, $p= 0,0000$). El Grupo Tetracloruro mostró una elevada actividad de esta enzima (Figura 32). Esta observación ha sido documentada por distintos autores, durante la evaluación de la actividad hepatoprotectora de diferentes sustancias, en la que han utilizado el modelo de intoxicación hepática con tetracloruro de carbono (Brend y Rumack, 1993; Kasper y col., 2006; Gupta y col., 2006; Surendra y Bodakhe, 2007; Takate y col., 2010; Heba y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011).

Se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre el Grupo Tetracloruro (valores muy altos) y el resto de los grupos experimentales, los que mostraron valores similares.

El análisis de varianza para la enzima *aspartato aminotransferasa* mostró diferencias estadísticas significativas entre las medias de todos los grupos ($F= 357,37$,

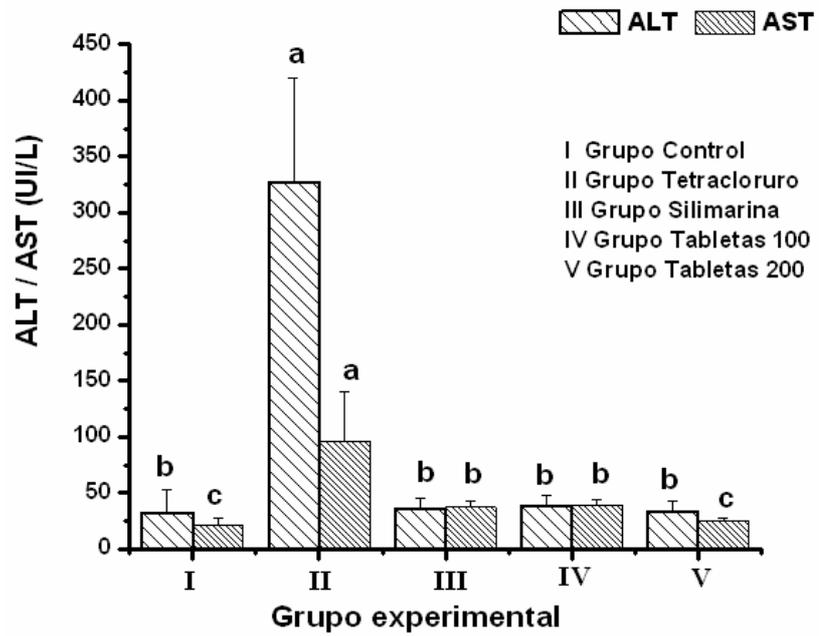


Figura 32. Comportamiento de actividad de las enzimas alanina (ALT) y aspartato (AST) aminotransferasas en el suero de los biomodelos experimentales durante el ensayo de hepatoprotección.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

$p=0,0000$). La actividad de esta enzima en el Grupo Tetracloruro se encontró muy elevada y fue diferente estadísticamente del resto de los grupos experimentales ($p<0.05$). Esta observación ha sido informada por diversos investigadores (Mankani y col., 2005; Surendra y Bodakhe, 2007; Takate y col., 2010; Manjunatha y col., 2011; Saha y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011). No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el Grupo Control y el Grupo Tabletas 200, y ambos fueron menores que los Grupos Silimarina y Tabletas 100, que resultaron similares.

Cuando aumenta la permeabilidad de la membrana del hepatocito, la integridad hepática se daña y se liberan grandes cantidades de estas dos enzimas al torrente sanguíneo. Este proceso aparece descrito en la intoxicación con tetracloruro de carbono (Recknagel, 1967; 1983, Brautbar y Williams, 2002), y ha sido informado con frecuencia en la literatura actual (Takate y col., 2010; Manjunatha y col., 2011; Saha y col., 2011; Heba y col., 2011). Los niveles de actividad de estas enzimas en los grupos tratados con las tabletas de ***Tamarindus indica* L.** se mantuvieron en niveles comparables a los del grupo control, evidenciándose la actividad protectora de las tabletas sobre la función hepática.

Este hecho pudiera estar relacionado con la presencia de los flavonoides en el principio activo de las tabletas de ***Tamarindus indica* L.** Los flavonoides son muy lipofílicos y presentan una gran afinidad por la membrana (Muraoka y col., 2002), hecho al que se ha asociado su potente actividad protectora (León y col, 2005). Adicionalmente los flavonoides pueden interferir en varios mecanismos de formación de radicales libres, como son el secuestro directo, la inhibición de la formación de óxido nítrico y la vía de formación por la xantina oxidasa, entre otros.

En todos los casos, los flavonoides incrementan la actividad de los antioxidantes endógenos (Nijveldt y col., 2001), pues la estabilidad del nuevo radical formado a partir del flavonoide original, al reaccionar con las especies reactivas de oxígeno, es muy alta (Hodnick y col., 1988).

La no diferencia entre los niveles de actividad de la alanina aminotransferasa en los grupos tratados con la Silimarina y con las tabletas de ***Tamarindus indica* L** en ambos niveles de dosis, con relación al Grupo Control, es una evidencia de que las tabletas protegieron la función hepática de los biomodelos experimentales, contra los

daños que produce la intoxicación con tetracloruro de carbono a nivel de la membrana celular del hepatocito. Las tabletas de tamarindo fueron capaces de mantener estable la actividad de esta enzima en los grupos en que se administraron. El efecto producido por las tabletas de tamarindo en dosis de 100 mg/kg de peso, fue igual al de la Silimarina. El efecto de la dosis 200 mg/kg de peso fue superior a ambos, manteniendo los niveles de actividad de esta enzima al mismo nivel que el Grupo Control.

III.5.4.2 Fosfatasa alcalina

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los cinco grupos experimentales para la fosfatasa alcalina ($F= 6243,75$, $p=0,0000$). La figura 33 muestra que la actividad de esta enzima aumentó significativamente en el Grupo Tetracloruro, comparada con el resto de los tratamientos. Esta observación se refiere en numerosas investigaciones que han utilizado este modelo de intoxicación hepática (Markani y col., 2005; Surendra y col., 2007; Takate y col., 2010; Patel y Shah, 2009, Bhoomannavar y col., 2011), para la evaluación de la actividad hepatoprotectora de fármacos de origen natural.

El Grupo Control mostró valores de actividad de la fosfatasa alcalina menor y diferente estadísticamente del resto de los grupos experimentales. No se encontraron diferencias en los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina entre el Grupo Silimarina y el Grupo Tabletas 200; por su parte el grupo Tabletas 100 fue diferente del resto de los grupos experimentales.

En presencia de enfermedad colestásica, la actividad de la fosfatasa alcalina suele estar elevada; sin embargo, los niveles de dosis ensayados en este trabajo mantuvieron la actividad de esta enzima en niveles ligeramente superiores y diferentes estadísticamente del Grupo Control en el biomodelo experimental utilizado. Las tabletas de tamarindo a la dosis de 200 mg/kg, fue la variante que mejor preservó la actividad de esta enzima.

El hecho de que la actividad de la fosfatasa alcalina se mantenga en niveles fisiológicos en los biomodelos intoxicados con tetracloruro de carbono, cuando se

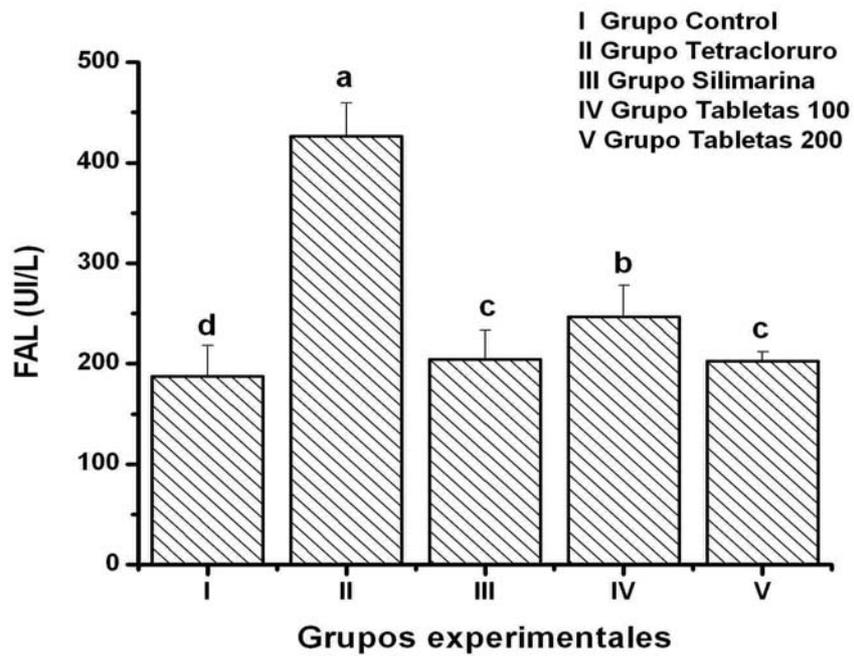


Figura 33. Comportamiento de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en los biomodelos experimentales, durante el ensayo de hepatoprotección.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

administra la tableta de ***Tamarindus indica* L.**, es un indicador de que el principio activo de esta, posee actividad moduladora sobre la función colestásica.

Como la elevación de la fosfatasa alcalina de origen hepático, no es totalmente específica de colestasis, se midió la concentración de gamma glutamil transpeptidasa en el suero. Esta enzima rara vez se eleva en otros trastornos que no sean las enfermedades hepatobiliares (Martin y col., 1984; Roca, 2007).

III.5.4.3 Gamma-glutamyl transpeptidasa

Los niveles de gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) se elevan en enfermedades hepatobiliares como la obstrucción hepática, cirrosis o tumores (Gender, 2001; Kasper y Braunwald, 2006), donde predominan las características de inhibición del flujo biliar (Kasper y Braunwald, 2006).

La GGT se encuentra presente en casi todos los tejidos del organismo, y sus niveles son particularmente altos en el hígado. La figura 34 muestra los resultados de la actividad de esta enzima en los cinco grupos experimentales. El análisis de varianza realizado a esta variable bioquímica, mostró la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los cinco grupos experimentales ($F= 235,05$, $p= 0,0000$).

La actividad de la enzima gamma-glutamyl transpeptidasa se observó incrementada significativamente en el Grupo Tetracloruro, y fue estadísticamente diferente del resto de los grupos experimentales. Este resultado fue similar a otros informes, en los que se ha visto afectada la actividad de esta enzima por la acción tóxica del tetracloruro de carbono (Markani y col., 2005; Surendra y Bodakhe, 2007; Patel y Shah, 2009).

Los niveles de actividad de esta enzima fueron iguales estadísticamente entre los Grupos Silimarina y el Grupo Tabletas 200. El Grupo Control y el Grupo Tabletas 100 fueron estadísticamente diferentes entre sí y del resto de los grupos experimentales.

La elevación estadísticamente significativa de la actividad de la fosfatasa alcalina, conjuntamente con la GGT en el Grupo Tetracloruro; es una evidencia positiva de lesión hepatobiliar producida por el tetracloruro de carbono, elemento ampliamente descrito en la literatura (Bhattacharya y col., 2003; Markani y col., 2005; Surendra y Bodakhe, 2007; Patel y Shah, 2009). Las tabletas de ***Tamarindus indica* L** restituyeron la actividad de estas dos enzimas en los biomodelos experimentales

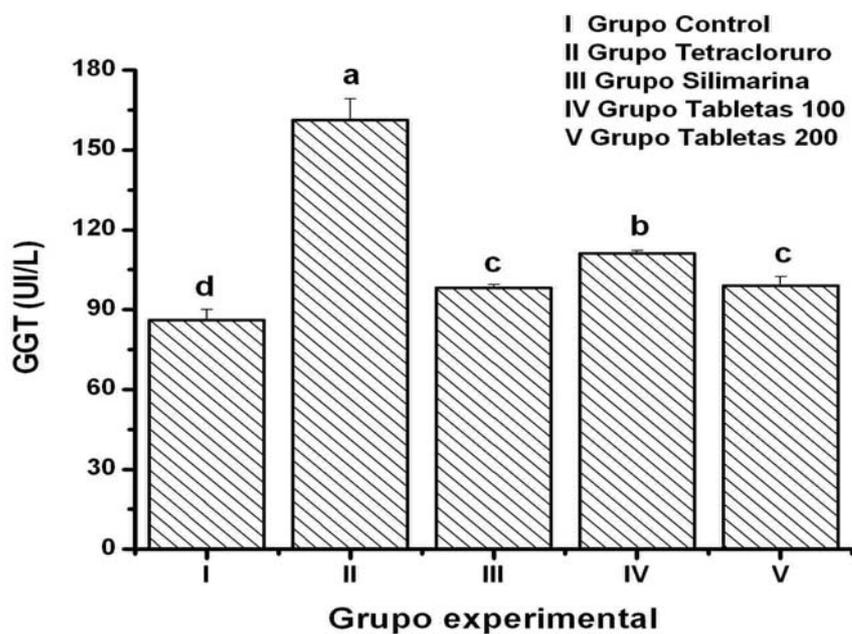


Figura 34. Comportamiento de la actividad de la enzima gamma glutamiltranspeptidasa en el suero de los biomodelos experimentales, en el ensayo de hepatoprotección.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

intoxicados, que recibieron el tratamiento con las tabletas de tamarindo en ambos niveles de dosificación, siendo mejor el efecto producido por las tabletas en la dosis de 200 mg/kg de peso.

La fosfatasa alcalina y la gamma-glutamil transpeptidasa no son los únicos enzimas que se afectan en cuadros colestásicos. Las bilirrubinas (directa e indirecta) son también compuestos que se elevan en las hepatopatías que producen daños colestásicos (Takate y col., 2010; Manjunatha y col., 2011, Heba y col., 2011).

III.5.4.4 Bilirrubina total y directa

El valor sérico de bilirrubinas representa una medida de la conjugación y excreción hepática siendo la alteración de este parámetro bioquímico típica de la disfunción hepática. La figura 35 presenta los valores de bilirrubina total y directa obtenidos en este estudio.

El valor sérico de bilirrubina total representa una medida de la función excretora y detoxificadora del hígado (Saraswat y col., 1993). Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las medias de los cinco grupos para la bilirrubina total ($F= 331,06$, $p=0,0000$). El Grupo Tetracloruro mostró una elevación de los niveles de bilirrubina total que fue estadísticamente diferente del resto de los grupos. Este hecho ha sido referido por distintos investigadores (Patel y Shah, 2009; Lewis y Mohanty, 2010, Heba y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011). El Grupo Control mostró una media diferente estadísticamente, del resto de los grupos experimentales. Los grupos Silimarina, Tabletado 100 y Tabletado 200 no fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$).

La bilirrubina directa se comportó de manera similar a la bilirrubina total. El análisis de varianza mostró la existencia de diferencias estadísticas significativas ($F= 66,96$, $p= 0,0000$). El grupo Tetracloruro y el grupo control; fueron distintos entre sí y del resto de los grupos, que mostraron medias similares ($p < 0.05$). De este modo, los resultados sugieren que las tabletas de ***Tamarindus indica* L**, en ambos niveles de dosis, tuvieron igual efecto que la Silimarina en la dosis de 150 mg/kg de peso.

El paso limitante en el metabolismo de la bilirrubina es el transporte de la bilirrubina conjugada o directa a los canalículos biliares. Como se discutió anteriormente, los

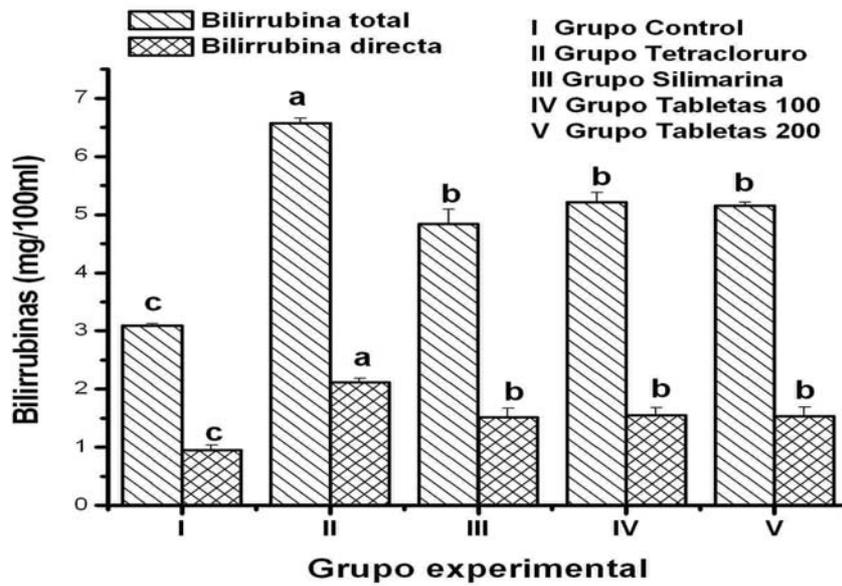


Figura 35. Comportamiento de la concentración de bilirrubina total y directa en el suero de los biomodelos experimentales.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

animales del Grupo Tetracloruro presentaron lesión colestásica, pues se encontraron altos niveles de fosfatasa alcalina y gamma glutamil transpeptidasa en el suero. Esta lesión propició un aumento de la bilirrubina total, y en especial de la fracción directa o conjugada. Esta observación aparece reportada en la literatura para las enfermedades hepáticas en general, y en especial cuando existen lesiones de las vías biliares causadas por tóxicos químicos, como el paraquat y el tetracloruro de carbono, entre otros (Martin y col., 1985; Kasper y Braunwald, 2006).

Este resultado se corresponde con informes de la literatura donde se ha observado hiperbilirrubinemia total, y en especial conjugada en los biomodelos tratados con tetracloruro de carbono (Patel y Shah, 2009; Amin y Ghoneim, 2009; Lewis y Mohanty, 2010, Heba y col., 2011).

Las tabletas de *Tamarindus indica* L mantienen los niveles de bilirrubina total y directa en el suero de los biomodelos experimentales, de los grupos tratados con ambos niveles de dosis, en valores que no difieren estadísticamente con los del Grupo Silimarina. La acción hepatoprotectora de las tabletas, disminuye o evita el daño a nivel de los conductos biliares, y modula adecuadamente el transporte de la bilirrubina. Ello puede ser una evidencia de que el principio activo contenido en las mismas, sea capaz de mantener la función excretora-detoxificadora del hígado, protegiendo este órgano del agente hepatotóxico aplicado.

III.5.4.5 Proteínas totales

El valor sérico de proteínas es una medida de la capacidad biosintética del hígado. La figura 36 presenta los resultados de las concentraciones de proteínas totales en el suero de todos los grupos experimentales.

El contenido de proteínas totales en el suero de las ratas de los cinco grupos experimentales mostró diferencias estadísticas significativas ($F= 62,22$, $p= 0,0000$). El Grupo Tetracloruro presentó un valor medio de proteínas totales significativamente diferente y menor que el resto de los grupos experimentales. Este hecho demuestra que la hepatotoxicidad producida por el tetracloruro de carbono afecta el normal desarrollo de la síntesis de proteínas en este órgano. Esta observación coincide con distintos informes de la literatura, en los que se ha evaluado la actividad

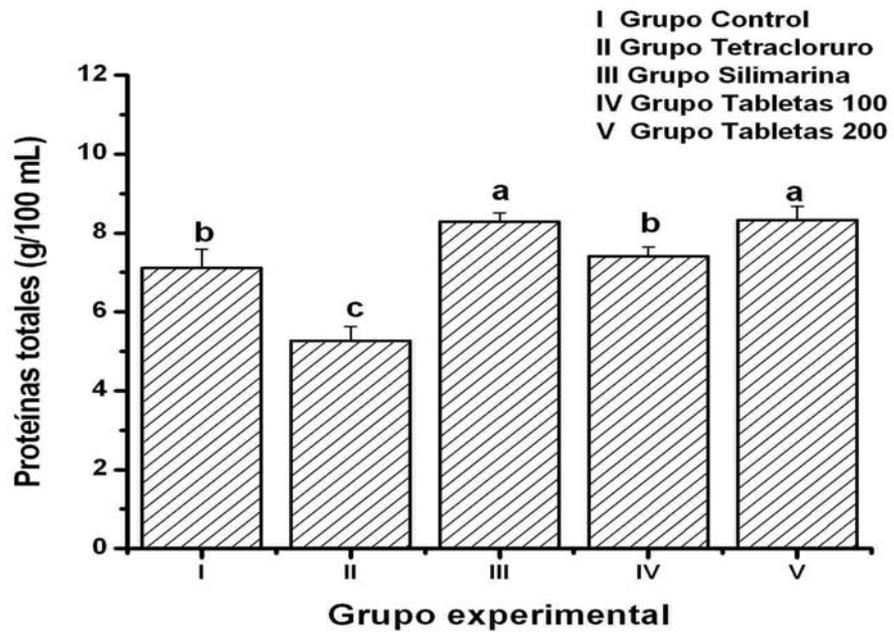


Figura 36. Comportamiento de los valores promedio de proteínas totales en el suero de los biomodelos experimentales.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

hepatoprotectora, en este modelo de toxicidad (Mankani y col., 2005; Lewis y Mohanty, 2010, Heba y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011).

La concentración sérica de proteínas totales en los grupos Control y Tabletas 100 (grupos con medias similares) fue menor que la de los grupos Silimarina y Tabletas 200, que no fueron diferentes estadísticamente ($p < 0.05$).

En la investigación de productos naturales con actividad hepatoprotectora, se ha referido generalmente una disminución de la síntesis de proteínas, causada por el tetracloruro de carbono (Girish y col., 2009; Yossef y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011; Heba y col., 2011). Estos informes se corresponden con los resultados observados en esta investigación.

La síntesis proteica de los biomodelos tratados con las tabletas de ***Tamarindus indica* L** en una dosis 200 mg/kg (Grupo Tabletas 200), se mantuvo en un nivel comparable con la de los biomodelos experimentales del Grupo Silimarina (150mg/kg). En ambos grupos se observó, que la síntesis proteica fue superior a la del Grupo Control, lo que constituye una evidencia de la actividad protectora de esta función hepática. Según indica este resultado, la dosis 200 mg/kg de tabletas fue capaz de mantener adecuadamente y en un mayor grado, la función biosintética del hígado en este grupo experimental.

III.5.4.6 Lípidos totales

El tetracloruro de carbono causa daño hepático a través de procesos de peroxidación de los lípidos presentes en la membrana del tejido hepático. Esto hace que aumente su permeabilidad y finalmente conlleva a la infiltración de grasas en los hepatocitos (Mankani y col., 2005).

El análisis de varianza realizado, mostró diferencias significativas entre las medias de los cinco grupos experimentales ($F = 336,58$, $p = 0,0000$). Se encontró un aumento importante de la concentración sérica de lípidos totales en el Grupo Tetracloruro que fue superior al resto de los grupos experimentales (Figura 37), este grupo fue diferente estadísticamente del resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

Este hecho ha sido referido en la literatura, donde se plantea que la intoxicación por tetracloruro de carbono y otros compuestos halogenados, incrementa los niveles de

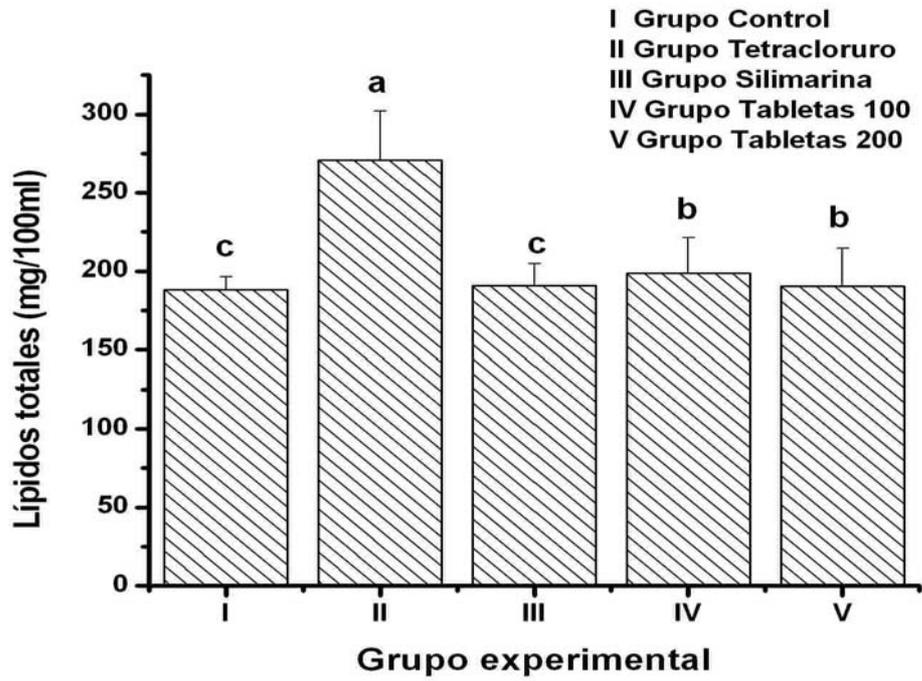


Figura 37. Valores de lípidos totales en el suero de los biomodelos experimentales, durante el ensayo de hepatoprotección.

Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas. (HSD de Tukey, $p < 0.05$)

lípidos totales en el suero de los biomodelos intoxicados, provocado por el aumento de la peroxidación lipídica, o sea a través de mecanismos oxidantes (Mankani y col., 2005; Surendra y Bodakhe, 2007; Girish y col., 2009; Yossef y col., 2011; Bhoomannavar y col., 2011; Heba y col., 2011). A este hecho contribuye que el tetracloruro de carbono es un compuesto muy lipofílico, que pudiera también actuar, aumentando la solubilidad de las grasas, facilitando su transporte hacia el torrente sanguíneo.

La concentración de lípidos totales en los grupos Control, Silimarina y Tabletas 200 no resultó diferente estadísticamente, y su valor fue menor que en el Grupo Tabletas 100, que fue a su vez diferente del resto de los grupos ($p < 0.05$).

De acuerdo con estos resultados, se puede inferir que las tabletas de ***Tamarindus indica* L.**, a una dosis de 200 mg/kg, tienen la capacidad de mantener la concentración de lípidos totales séricos, de biomodelos intoxicados con tetracloruro de carbono, en niveles que no difieren significativamente de la concentración lipídica normal. El resultado obtenido fue análogo al observado con la Silimarina, que es el compuesto hepatoprotector estándar en la investigación de esta actividad farmacológica, según la literatura especializada (Pulido y col., 2000; Martínez y col., 2002; Linden, 2008; Sreelatha y col., 2009, Amin y Ghoneim, 2009).

El efecto observado en la concentración de lípidos séricos, asociada al tratamiento con las tabletas de ***Tamarindus indica* L.**, pudiera estar relacionado con el hecho de que los compuestos flavonólicos poseen una alta lipofilia y se unen a los lípidos de la membrana produciendo así un efecto protector (Hodnick y col., 1988). Esta evidencia se sustenta en que los compuestos que forman los flavonoides al secuestrar radicales libres en la membrana del hepatocito, son muy estables, y actúan protegiendo la membrana e impidiendo de este modo el ataque a los lípidos (Muraoka y col., 2002). A los efectos anteriores, probablemente; se suma la presencia en las tabletas de tamarindo de la vitamina C y de α -tocoferol, que actúan conjuntamente protegiendo la membrana del ataque de radicales libres.

Está reportado en la literatura que la vitamina E es el principal antioxidante en tejido adiposo y como la principal defensa frente a la peroxidación lipídica, ya que impide la propagación de los radicales libres (Ricciarelli y col., 2001).

Por último y no menos importante, pudiera ser la presencia de selenio en las tabletas de *Tamarindus indica* L. Se ha referido que el selenio es capaz de mantener, en modelos de intoxicación hepática, niveles bajos de los ésteres de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y de ácidos grasos mono y poliinsaturados (Newairy y col., 2007).

III.5.4.7 Sinergia en la actividad hepatoprotectora de las tabletas de tamarindo

Los radicales libres están implicados en la patogénesis de la toxicidad hepática producida por el tetracloruro de carbono. Su efecto causa alteraciones en el metabolismo de la glucosa, los lípidos y las proteínas que son sintetizados en el hígado (Farghali y col., 2000; Bhattacharya y col., 2003).

La peroxidación lipídica iniciada en la intoxicación inducida por tetracloruro de carbono, juega un papel importante en la descompensación de todas las funciones hepáticas (Farghali y col., 2000; Bhattacharya y col., 2003).

En los extractos vegetales no se puede atribuir la actividad antioxidante a un metabolito o a una sustancia en particular; por extensión, sucede lo mismo con las sustancias hepatoprotectoras. Las sustancias antioxidantes actúan de manera conjunta en sus efectos, como es el caso de antioxidantes no enzimáticos exógenos, como las vitaminas C y E en su función al nivel de la membrana celular (Sies y Stahl, 1995; Hill y col., 2003), y el sistema enzimático endógeno (catalasa-superóxido dismutasa-glutatión) en el interior del hepatocito (Martin y col., 1984; Heba y col., 2011).

Estos elementos sugieren que la acción “*sinérgica*” de todos los metabolitos presentes en el EBT, sea la que produzca, a través de diversos mecanismos, una potente acción antioxidante y hepatoprotectora. En este sentido el potencial de las tabletas de *Tamarindus indica* L como antioxidante y hepatoprotector es muy elevado.

Esta observación se apoya también en numerosos informes de la literatura que sostienen, que los extractos íntegros obtenidos de las plantas medicinales, poseen mayor actividad que la de cualquiera de sus fracciones o metabolitos individuales. Se conoce que la actividad antioxidante de la silibina (flavonoide extraído de la

Silimarina) es mucho menor que la de la Silimarina (Migues y col., 1993), y que existe una fuerte acción sinérgica antioxidante entre la quercetina y el α -tocoferol (Pedrielli y Skibsted, 2002).

De manera general, se sugiere que la actividad de los extractos de plantas medicinales se debe, a su riqueza de metabolitos, ya que los mismos metabolitos, ensayados individualmente no tienen efectos consistentes (Hai, 2004).

Se ha referido la acción sinérgica en la actividad antioxidante y hepatoprotectora, de muchos de los metabolitos presentes en el EBT. Entre ellos se encuentran la *vitamina C* y el α -tocoferol (Finotti y col., 2000 ; Ricciarelli y col., 2001); el linalool con los polifenoles (Kulevanova y Kadifkova; 2001); el γ -terpineno y *p*-cimeno (Sonbolia y col., 2005); α -tocoferol y β -sitosterol (Finotti y col., 2000); los ácidos cafeico y ferúlico con sus respectivos ésteres fenílicos (Hong y Tang, 2004 y el selenio con vitamina E (Aboul-Soud; 2011).

Sobre la base de esta potente “*sinergia*” se fundamenta en esta investigación, la potencialidad hepatoprotectora de las tabletas de ***Tamarindus indica L*** (y de sus extractos en general), pues en su conjunto, la riqueza de metabolitos que contienen, ha permitido restablecer la función hepática de los biomodelos experimentales, a la normalidad, después de la intoxicación con tetracloruro de carbono, mostrando una elevada actividad antioxidante y hepatoprotectora.

Estas actividades presentes en el EBT, principio activo de las tabletas desarrolladas en esta tesis, se sustenta primeramente en que es capaz de activar la respuesta del sistema de primera línea de defensa antioxidante: el sistema enzimático endógeno. En segundo lugar, en que mantiene los niveles de sustancias antioxidantes que pertenecen al sistema de defensa redox no enzimático endógeno, y en tercer lugar, aporta numerosos metabolitos que forman parte del sistema de defensa redox no enzimático exógeno (flavonoides, vitaminas, aceites esenciales, ácidos grasos, etc.). Estos tres elementos, actuando sinérgicamente en el proceso del restablecimiento del balance redox celular, permiten fundamentar los resultados obtenidos en este trabajo, para contar con una forma farmacéutica con actividad antioxidante y hepatoprotectora, que pueda contribuir en el futuro, al tratamiento de las hepatopatías en el Sistema de Salud Cubano.

CONCLUSIONES

1. La estandarización del extracto blando de las hojas de ***Tamarindus indica* L.**, permitió establecer límites de calidad a escala de laboratorio, para sus propiedades organolépticas, físicas, fisicoquímicas y químicas, y los principales metabolitos responsables de la actividad antioxidante y hepatoprotectora, que posibilitan su utilización como ingrediente farmacéutico activo para la elaboración de diversas formas farmacéuticas.
2. El método de granulación húmeda y el diseño experimental utilizado posibilitaron el desarrollo de una nueva formulación de tabletas, a partir del extracto blando estandarizado de las hojas de ***Tamarindus indica* L.**, con propiedades tecnológicas que satisfacen los requisitos de calidad establecidos para esta forma farmacéutica, las que pueden ser predichas a través de modelos teóricos. La estabilidad integral de las tabletas, verificada hasta el momento, es de nueve meses.
3. Las tabletas formuladas con el extracto blando estandarizado de las hojas de ***Tamarindus indica* L.** pueden considerarse seguras en las condiciones experimentales utilizadas, al coproducir toxicidad aguda oral a la dosis límite de 2000 mg/kg en ratas Sprague Dawley, y causar una irritabilidad media de la mucosa bucal en el modelo de Hámster sirio dorado, relacionada con la composición del ingrediente farmacéutico activo.
4. La administración oral de tabletas del extracto blando estandarizado de las hojas de ***Tamarindus indica* L.** a ratas Sprague Dawley tratadas con tetracloruro de carbono, ejerció efectos antioxidantes que se manifestaron a nivel de la inhibición de la peroxidación lipídica y favoreció además, el restablecimiento del balance redox celular, en términos de la concentración de glutatión reducido y de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.
5. Las tabletas formuladas con el extracto blando estandarizado de las hojas de ***Tamarindus indica* L.** mostraron una marcada actividad hepatoprotectora en ratas Sprague Dawley tratadas con tetracloruro de carbono, preservando la integridad celular y las funciones biosintética y excretora detoxificadora de este órgano, de modo análogo a la Silimarina, fármaco hepatoprotector de referencia.

RECOMENDACIONES

1. Realizar el escalado piloto del EBT para poder corroborar los límites de calidad propuestos durante la estandarización a escala de laboratorio.
2. Continuar el estudio de estabilidad de las tabletas de ***Tamarindus indica* L.** por cromatografía de capa delgada para establecer el tiempo de vencimiento de esta formulación.
3. Realizar el estudio de irritabilidad de la mucosa gástrica, así como ensayos de toxicidad a dosis repetida, para evaluar la seguridad de las tabletas durante tiempos más prolongados de exposición.
4. Preparar granulados y tabletas a escala piloto e industrial, para poder introducir la nueva formulación de tabletas obtenida a partir del extracto blando de las hojas de la especie ***Tamarindus indica* L.**
5. Realizar estudios fármaco toxicológicos, para evaluar la actividad de los extractos y las tabletas de ***Tamarindus indica* L** en otras afecciones que cursan con estrés oxidativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboudoulatif D, Kwashie E, Amegnona A, Kodjo A, Edmond E, Messanvi G. Acute and Sub-chronic (28-day) Oral Toxicity Studies of Hydroalcohol Leaf Extract of *Ageratum conyzoides* L (Asteraceae). *Trop. J. Pharm. Res.* 2010; 9 (5): 463-467
- Abdel-Wahhab MA, Abdel-Azim MA y El-Nekeety AA. “*Inula crithmoides* extract protects against ochratoxin A-induced oxidative stress, clastogenic and mutagenic alterations in male rats. *Toxicol.* 2008; 52(4): 566–573
- Aboul-Soud MA, Al-Othman AM, El-Desoky GE, Al-Othman ZA, Yusuf K, Ahmad J, Al-Khedhairi AA. Hepatoprotective effects of vitamin E/selenium against malathion-induced injuries on the antioxidant status and apoptosis-related gene expression in rats. *J Toxicol Sci.* 2011; 36(3): 285-96
- Adama L, Fulbert LL, Pierre GI, Jean-Baptiste N. Traditional medicine in kidney diseases in Burkina Faso. *Nephrol. Ther.* 2010; 6(1): 35-39.
- Adeneye CM y Brittain HG. (Editores) Preformulation in solid dosage form development. Informa Healthcare. NY. USA. 2008
- Aebi H, “Catalase *in Vitro*”, *Methods in Enzymology.* 1984; 105: 121-126
- Akerboom TP and Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.*, 1981; 77: 373-382
- Akerele O. WHO’s Traditional Medicine Programme, Progress and perspectives. *Who Chron.* Geneva. Suiza. 2004: 38-47.
- Amin A y Ghoneim M. *Zizyphus spina-christi* protects against carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats. *F Chem Toxicology.* 2009; 47: 2111–2119.
- Angiosperm Phylogeny Group. An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linnean Soc.* 2003; 141: 399-436.
- Anon E. *Tamarindus indica* L. In *The Wealth of India (Raw Materials Series) Vol. X: 144-122.* Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India. 1976.

- Babich H, Schuck AG, Weisburg JH y Zuckerbraun HL. Research Strategies in the Study of the Pro-Oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals. *Int. J. Toxicol.* 2011, ID: 467305. 12p
- Banker GS and Rhodes CT. Modern Pharmaceutics. Marcel Dekker SG. NY. USA. 2002. np
- Bathia UK, Gupta SR, Shishadi TR. C-glycosides from *Tamarindus indica* L leaves. *Phytochemistry.* 1966; 5(1): 177-181.
- Bergmeyer HU, Holder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Comitee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1986, 24: 497-510; 481-495
- Betancourt VM, González de la Cruz YL, Fernández FN, Gutiérrez MN, Cadenas FJ. Defensas antioxidantes en la insuficiencia renal crónica experimental. *Rev. Cub. Invest. Biom.* 2011; 30(2):292-300
- Bhattacharya D, Mukherjee R, Pandit S, Das N, Sur TK. Prevention of carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats by *Himoliv*®, a polyherbal formulation. *Indian J. Pharmacol.* 2003, 35: 183-185.
- Bhoomannavar VS, Shivakumar SI, Hallikeri CS y Hatapakki B K. Hepatoprotective activity of leaves of *Neptunia Oleracea* lour in Carbon tetrachloride induced rats. *J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2011, 2(2): 309-315
- Bihari PB, Gaur K, Nema RK, Sharma CS, Jain AK, Jain CP. Hepatoprotective activity of *Jatropha gossypifolia* against carbon tetrachloride- induced hepatic injury in rats. *A J Pharm and Clinical Research.* 2009; 2(1): 50-55
- Brautbar N, Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms. *Intl. J. Hyg. Environ. Health.* 2002; 205: 479–491.
- Benkendorff K, Davis AR, Rogers CN, Bremner JB. Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic mollusks, and their associated antimicrobial properties. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2005; 316: 29–44.

- Blasco AJ, Rogelio MC, González MC, Escarpa A. Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. *Anal. Chim. Acta.* 2005; 539: 237-244
- Brend JA, Rummack BH. Role of free radical in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury. *Clin. Toxicol.* 1993; 31(1):173-196
- Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.* 2008; 585(2-3): 325-337.
- Brines J, Codoñer P. Hepatopatías agudas. En: Cruz M. Tratado de Pediatría. Ergon. Madrid, España. 2006. p.1188-1201.
- British Pharmacopoeia (BP). Her Majesty Stationary Office. London; UK. 2010. CD-Rom
- Britton RS, Bacon BR. Role of free radical in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology.* 1994, 41: 343-348
- Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 1981; 103: 6472 - 6477
- Carr RL. Evaluating flow properties of solids. *Chem Engineer.* 1965; 72: 163-168.
- Castiñeira M. Control de medicamentos I. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1986. p. 220-4.
- Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids.* 2009; 157 (1): 1-11.
- CCC. (Cayman Chemical Company). Superoxide Dismutase Assay Kit, de Cayman Chemical Company, USA. 2010
- Cecchini T. Enciclopedia de las Hierbas y Plantas Medicinales. Ed. De Veechi, Italia: 1983: p:441-442
- CECMED. Regulación 16/2006. Directrices sobre Buenas Prácticas para la Fabricación de productos farmacéuticos. Anexo 03: Buenas Prácticas de Fabricación de medicamentos herbarios. MINSAP. Ciudad de la Habana Cuba. 2006.

- CECMED. Regulación 29/02. Requisitos para las solicitudes de Autorización de uso de medicamentos de Origen natural de uso humano, de Producciones locales y dispensariales. Ciudad de la Habana Cuba. MINSAP. 2002
- CDER. (Center for Drug Evaluation and Research) Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Food and Drug Administration. USA. 1997.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 2009; 83: 519–548
- Clark LC, Combs JR, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* 1996; 276(24): 1957–1963.
- Cooks RD y Weisberg S. Residuals and influence in regression. Monograph in statistical applied probabilities. Chapman and Hall. London. UK. 1986
- Danish FQ y Parrott EL. *J. Pharm. Sci.*, 60: 548 (1971), en Lieberman H y Lachman L. Pharmaceutical Dosage Forms, Tablets. Marcel Dekker. New York. USA. 1981. (2) : 300
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995; 61:1- 31.
- Dehesa MA, Escalona-Arranz JC, Santiesteban R, Lores D. Evaluación Químico Farmacéutica de las hojas del *Tamarindus indica* L. *Etnomedicina.* 1995; 1:147-156
- Dehesa MA. Estudio Farmacognóstico y preclínico del extracto fluido en etanol al 80% de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L. Tesis en Opción al Título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Ciudad de la Habana. 2005: 53-82.
- Dehesa M, Jáuregui O, Cañigüeral S. Estudio por HPLC-MS/MS de compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Tamarindus indica* L. *Rev. de Fitoterapia* 2006. 6(SI):116
- De Leve L y Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 1991; 52: 287-305

- De Luca, PP. Call for Papers. International Symposium on Microencapsulation. *AAPS PharmSciTech*. 2007; 7 (4): E1.
- Deshwal N, Kumar SH, Sharma P. Review on hepatoprotective plants. *IJPSR and Research*. 2011; 7(1): 15-26
- Deulofeu R, Parés A, Rubio M, Gassó M, Román J, Giménez A, Varela MG, Caballeria J, Ballesta AM, Mato JM y Rodés J. Sadenosylmethionine prevents hepatic tocopherol depletion in carbon tetrachlorideinjured rats. *Clin. Sci*. 2000; 99: 315-320
- Díaz BJ, Martínez MC, Alfonso CA, Pardo TA, Esmérito BJ, Salas MH, Puente ZE, Sedeño SN. Evaluación de la toxicidad aguda oral e irritación sobre mucosa bucal de la solución CM-95 tratada magnéticamente. *Acta Toxicol. Argent*. 2008; 16(2): 34-40
- Dirección Provincial de Salud. MINSAP. Informe de Consumo de Medicamentos. Santiago de Cuba, 2010
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biol. Med.*. 2002; 32(11),1102-1115.
- Draize JH; Woodard D; Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol and Exp. Therap*. 1994: 337
- Doughary JH. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* L. *Trop. J. Pharm. Res*. 2006: 5 (2): 597-603
- Elizabetsky E y Moraes JE. Ethnopharmacology: atechanical development startegy. 3er International Congress of Etnobiology. UK 2004.
- El-Siddig, K. Tamarind. *Tamarindus indica* L Fruit for future 1. ICUC: Southamton, Revised edition. UK. 2007.
- Ericsson L, Johansson E, Wikström C. Mixture design-design generation, PLS analysis, and model usage. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*. 1998. 43.21.
- Escalona JC, Dehesa MA, Boizzan ML. Evaluación preclínica del efecto hepatoprotector de extractos flavonólicos de las hojas de *Tamarindus indica* L. *Rev Cub Farmacia*.1995; 30: 292-297.

- Escalona JC, R. Péres, I. Urdaneta, M. I. Camacho, J. R. Rodríguez, I. Licea, Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. *Pharmacog Mag.* 2010^a; 6: 242-249
- Escalona AJ, Pérez RR, Licea JI, Rodríguez AJ, Argota CH, Cañizares LJ, Morris AH, Sierra GG. Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. leaves. *Rev Cub Química.* 2010^b; 22(3): 65-71
- Escalona AJ. Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L como premisa para su introducción en la medicina complementaria. Tesis Doctoral. Ciudad de la Habana. Cuba. 2011^a
- Escalona JC, Rodríguez AJ, Pérez RR, Cañizares LJ, Sierra GG, Morris QH, Licea JI. Metabolites extraction optimization in *Tamarindus indica* L. leaves. *BLACPMA.* 2011^b; 10(4): 359 – 369
- EURACHEM. Guide "The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics "First English Edition 1. London. UK. 2006
- European Agency for The Evaluation of Medicinal Product (EMA). Note for Guidance on Stability Testing of Existing Active Substance and Related Finished Product (Draft), February .2002.
- Evans P y Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit. J. Nutr.* 2001; 85: 67-74.
- Farghali H, Kamenikova L, Hynie S, Kmonickova E. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharm Research.* 2000; 41: 231-237.
- Farnsworth N y Morris RW. Higher plants – the sleeping giant of drug development. *Am J Pharm.* 2005; 148: 46-52.
- Fernández CM, Lisandra MY, Fernández EG, Pérez SI, Jiménez CB. Optimization of a Meprobamate Fast Released Tablet Formulation Using Mixture Design. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008; 27(1): 62-7
- Fernández-Checa J, Lu S, Ookhtens M, DeLeve L, Runnegar M, Yoshida H, Saiki H, Kanan R, García-Ruiz C, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. The Regulation of

- Hepatic Glutathione. En *Hepatic Anion Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology*. Marcel Dekker, New York. USA. 1992. p. 363-395.
- Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Collet A, Miranda M, Mai M, Ardite E, Morales A. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: 7-17
- Finotti E, D'Ambrosio M, Paoletti F, Vivanti V y Quaglia G. Synergistic effects of α -tocopherol, β -sitosterol and squalene on antioxidant activity assayed by crocin bleaching method. *Food / Nahrung*. 2000; 44: 373–374.
- Formulario Nacional de Fito y Apifármacos. ECIMED. La Habana. Cuba. 2010
- Francavilla R, Miniello VL, Brunetti L, Lionetti ME, Armenio L. Hepatitis and cholestasis in infancy: clinical and nutritional aspects. *Acta Paediatr.* 2003; (91):101-104
- Gabrielsson J, Lindberg N, Lundstedt T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. *J Chemometrics*. 2002; 16: 141-160
- Gad SC y Weil CS. Statistics for toxicologist. En Principles and methods of toxicology. 3er Ed. Raven Press LTD. NY. USA. 1994: 435-483
- Gendler S. γ -GT en Kaplan A. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Canada. 2001; 1120-1123.
- Gibson M. (Editor). Pharmaceutical Preformulation and Formulation. A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. INterpharm CRC. Washinton DC. USA. 2004
- Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. Review Article. *Free Radical Bio. Med.* 2010; 48: 1121–1132
- Girish C, Koner BC, Jayanthi S, Raot KR, Rajesht T, Pradhan SC. Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice. *Indian J Med Res.* 2009; 129: 569-578
- Graça MM. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*. 2010; 15: 9252-9287
- Gueye M, Diouf M. Traditional leafy vegetables in senegal: diversity and medicinal uses. *Afr. J. Trad. Complem. Altern. Med.* 2007; 4(4): 469-75.

- Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (GQUAL). *Natural Research Council Institute of Laboratory Animal Resources. Commission of Live and Sciences*. Editora Mexicana. Distrito Federal. México. 2002.
- Gupta AK, Chitme H, Dass DK, Misra N. Antioxidant activity of *Chamomile recutita capitula* methanolic extracts against CCl₄-induced liver injury in rats. *J. Pharmacol. Toxicol.*, 2006; 1: 101-107
- Hai LR. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. The journal of nutrición. En International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. *Am Soc Nut Sciences*. 2004: 3479S-3485S.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 2004, 142 (2): 231-255.
- Han D, Loukianoff S, McLaughlin L, Chandan KS, Facsm LP, Fos O. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier Science B.V., Amsterdam 2000, pp. 433-483.
- Hassan SW, Salawu K, Ladan MJ, Hassan LG, Umar RA y Fatihu, MY. Hepatoprotective, Antioxidant and Phytochemical Properties of Leaf Extracts of *Newbouldia Laevies*. *Int. J. PharmTech Res.* 2010; 2(1): 573-584
- Havinga RM, Hartl A, Putscher J, Prehler S, Buchmann C, Vog CR. *Tamarindus indica* L. (Fabaceae): patterns of use in traditional African medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 127(3): 573-88.
- Harvard Medical Asea (HMA). Guideline. Guideline for animals studies involving death as an end point . 1999
- Hayes, W. Principles and methods of toxicology. 2nd Ed. Raven Press. NY. USA. 1994: 54-58
- Heba E, Youssif AA, Khedr Z and Mohamed ZM. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Zizyphus spina-christi* fruits on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Nature and Science*. 2011; 9(2):1-7
- Hill KE, Montine TJ, Motley AK, Li X, May JM, Raymond FB. Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77: 1484-1488

- Hodnick W, Milosalvjevic E, Nelson J: Electrochemistry of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1988, 37: 2607- 2611.
- Hong J, Tang CH. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45(7): 2374–2378
- Iftekhhar AS, Rayhan I, Quard MA, Akhteruzzaman S, Hasnat A. Effect of *Tamarindus indica* fruits on blood pressure and lipid-profile in human model: an in vivo approach. *Pak J Pharm Sci.* 2006; 19: 125-129
- Imam S, Azhar I, Hasan MM, Ali MS, Ahmed SW. Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tamarindus indica* Linn. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2007; 20(2): 125-127.
- Iraizoz A, Bilbao RO, Barrios MA. Conferencias de Tecnología Farmacéutica II. IFAL. Universidad de La Habana, ENPES, Ciudad Habana. Cuba. 1992
- ISO/DIS 10993/10. Biological evaluation of medical devices part 10. Test for irritation and standarization. 2002. 37-40.
- Jiménez PG, Arbesún P, Puente ZE, Betancourt HJE, Pérez AI, Pascual SSR. Toxicidad Oral Aguda de un Fertilizante Foliar. *REDVET.* 2006; 7 (4): 1-5
- Joyeux M, Mortimer F. Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plants extracts used in Caribbean folk medicine. *Phytother. Res.* 1995; 9(3): 228-230
- Kaplowitz N. Mechanism of liver injury. *J. Hepatol.* 2000. 32: 39-47
- Kaplowitz N, Tsukamoto H. Oxidative stress and liver disease. *Probl. Liver Dis.* 1996, 14: 131-59
- Kaplan A y col., Alkaline phosphatase. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Canadá. 1984^a; 1094-1098.
- Kaplan A y col., Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Canadá. 1984^b; 1238-1241, 436 and 650.
- Kaplan A y col., Lipids. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Canadá. 1984^c; 918-919.
- Karunasinghe N, Ferguson LR, Tuckey J y Masters J. Hemolysate Thioredoxin Reductase and Glutathione Peroxidase Activities Correlate with Serum Selenium

- in a Group of New Zealand Men at High Prostate Cancer Risk. *J Nutr.* 2006;136: 2232-2235
- Kasper DL, Braunwald E (Eds). *Harrison's Principios de medicina interna*. McGraw Hill. 16^a Edición. Florida. USA. 2006.
- Khazada SK, Shaikh W, Shahzadi S, Kazi TG, Usmanghani K, Kabir A, Sheerazi TH. Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. medicinal plant in Sindh. *Pak. J. Bot.* 2008; 40(6): 2553-2559
- Komutarin T. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* L. inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem. Toxicol.* . 2004; 42(4): 649-658.
- Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 1992; 6: 724-730.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A. Phytochemical antioxidants for health and medicine. A move towards nature. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 2007; 1(4): 97-104.
- Kulevanova S, Kadifkova TP. Antioxidant activity of essential oils of different Wild *thymus* l. Species. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia.* 2001; 20(1): 61-66
- Kumar V, Kothari SH, Banker GS. Compression, Compaction, and Disintegration Properties of Low Crystallinity Celluloses Produced Using Different Agitation Rates During their Regeneration from Phosphoric Acid Solutions. *AAPS PharmSciTech* 2001; 2 (2): 1-7
- Lee KJ, Choi JH, Jeong HG. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 2118-2125
- León OS; Martínez SG, Candelario JJ, García GI, Bilbao RT, Ledesma RL. Balance antioxidante-prooxidante: salud y enfermedad. IFAL. UH. 2005
- Lewis JR y Mohanty SR. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. *Dig Dis Sci.* 2010; 55:560-578.
- Lewis YS y Neelakantan S. The chemistry, biochemistry and technology of tamarind. *J. Sci. Ind. Res.* 1964; 23: 204.

- Lieberman H y Lachman L. *Pharmaceutical Dosage Forms, Tablets*. Marcel Dekker. New York. USA. 1981. (2)
- Linden A, Gulden M, Martin HJ, Maser E, Sibert H. Peroxide induced cell death and lipid peroxidation in glioma cells. *Toxicol. Vitro*. 2008; 22: 1371-1375.
- Liolios CC, Sotiroudis GT, Chinou I. Fatty Acids, Sterols, Phenols and Antioxidant Activity of *Phoenix theophrasti* Fruits Growing in Crete, Greece. *Plant Foods Hum. Nutr*. 2009; 64: 52–61.
- Lira SLA; González O, G; Ros P, P; and Christian S, C. "Optimization of Tablets Containing a High Dose of Spray-Dried Plant Extract: A Technical Note". *AAPS PharmSciTech*; 2005^a; 6 (3): 24-29
- Lira SLA, González OG, Ros PP, y Christian SC. "Optimization of Tablets Containing a High Dose of Spray-Dried Plant Extract: A Technical Note". *AAPS PharmSciTech*; 2005^b; 6 (3),46-54.
- Loguercio C y Federico A. Selenium also represents a protective agent against lipid peroxidation, liver injury. Oxidative stress in Viral and Alcoholic Hepatitis. *Free Radical Biol. Med*. 2003; 34(1): 1–10.
- López RG, Suárez DA. Albumin and transferrin are antioxidants that prevent lipoperoxidation *in vitro*. *Rev. Latinoamer. Quím*. 2010; 38(3): 159- 167
- Lores D, Mariño RO y Dehesa MA. *Tamarindus indica L* una especie hepatoprotectora. Estandarización de la droga cruda. Preparación de extractos fluidos. Disertación. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba. 1998
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*.1999; 13: 1169-1183
- Lynch M y Kuramitsu H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes & Infection*. 2000; 2: 1245-1255.
- Malstrom B, Andreasson L, y Reinhammer B. *en* The Enzymes. Boyer P, editor. XIIB, Academic Press, New York. 1975. p.533.
- Mankani KL, Krishna V, Manjunatha BK, Vidya SM, Jagadeesh SD. Evaluation of hepatoprotective activity of stem bark of *Pterocarpus marsupium Roxb*. *Indian J Pharmacol*. 2005; 37(3): 165-168

- Manjunatha BK, Mankani KL, Mukunda SK, Divakara R, Sridar BK, Paul K. Antioxidant and Hepato Protective Effect of *Myristica malabarica* Seed Aril Extracts on Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Damage. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 2011; 6(1): 25-30
- Marin KM, Ehrlich V, Delatour T, Cavin C, y Schilter B. (Revisión) Evidence for a Role of Oxidative Stress in the Carcinogenicity of Ochratoxin A. *J. Toxicology.* 2011. ID 645361, 15p.
- Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW y Granner DK. Harper's review of biochemistry. Lange Medical Publication. California. USA. 1985.
- Martindale W. Martindale: The extrapharmacopeia, 30 Edición. Editorial Pharm Press. London, United Kingdom. 1993: 909-910.
- Martínez FS; González G J; Culebras M; Muñón, MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. (Reveew). *Nutr. Hosp.* 2002; 22(6): 271-278
- Martinez NY. Efecto diurético del *Tamarindus indica* L. en ratas. *Rev. Cub. Farmacia.* 2007; 41 (2):179.
- Martinele F, Soares FM, Franco JJ, Santos AC, Sugohara A, García SB, Curti C, Uyemura SA. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 810-808
- Maznah I, Mariod A, Bagalkotkar G, Lingb HS. Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of *Cantaloupe* extracted by supercritical fluid extraction. *Fats Oils.* 2010; 61(1): 37-44.
- Medina GA. Efecto antihepatotóxico del *Tamarindus indica* L. Actualizado Mayo 2001. Disponible en <http://www.revistaciencias.com>. Fecha acceso 10/07/2011.
- Migues MP, Amundi I, Sainz PLA, Lindros KOP. Comparative study of the heopatoprotective effects of silymarin and silybin on isolated rat hgepatocytes. *Toxic. In Vivo.* 1994; 8(4): 581-583
- Ministerio de Salud Pública. NRSP 311. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Proceso tecnológico. La Habana. Cuba. 1991
- Ministerio de Salud Pública. NRSP 312/91 Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo. La Habana. Cuba. 1991

- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Res.* 2002; 36: 1199–1208.
- Misharina TA, Polshkov AN. Antioxidant properties of essential oils: autoxidation of essential oils from *Laurel*, Fennel and their mixtures with essential oil from *Coriander*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005; 41(6): 610-618.
- Montgomery DC. Design and analysis of experiments. John Wiley. NY. USA. 2000
- Mosberg AT and Hayes WA. Subchronic toxicity testing. En Principles and methods of toxicology. 2nd Ed. Hayes WA. Raven Press. LTD NY. USA. 1989
- Mourtzinis I, Kalogeropoulos N, Papadakis NE, Konstantinou K y Karathanos VT. Encapsulation of Nutraceutical Monoterpenes in B-Cyclodextrin and Modified Starch. *JFS.* 2008; (73), 89-94
- Muraoka K, Shimizu K, Sun X. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF-kappaB. *Transplant Proc.* 2002; 34:1335-1340.
- Myers P y Montgomery DC. Response Surface Methodology, John Wiley and Sons. New York, 1995.
- Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues: Potent Nitric Oxide Inhibitors from the Netherlands Propolis. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26(4): 487-491.
- Naderi GA, Asgary S, Ani M, Sarraf-Zadegan N, Safari MR. Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 267: 59–66.
- Narendra C, Srinath MS, Prakash BR. Formulación y evaluación de comprimidos sublinguales con sulfato de terbutalina: estudios de optimización *in vitro*. *Ars Pharm.* 2005; 46(2)139-158.
- Newairy AA, El-Sharaky AS, Badreldeen MM, Eweda SM, Sheweita SA. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology.* 2007; 242(1-3): 23-30.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, y Leeuwen PAM. (Revisión) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74: 418–25.

- OECD 423. Guideline for Testing of Chemical. Acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001
- OECD 425. Guidelines for the testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure. 2008
- Omar ME, Abdel S, Amany A, Sleem, Nermeen MS. Hepatoprotective effects of citric acid and aspartame on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. *EXCLI Journal*. 2009; 8: 41-49
- OMS. Quality control methods for medicinal plant materials. WHO Library Cataloguing. Geneva. Switzerland. 2005
- OMS. Blood Safety and Clinical Technology. Guidelines on Standard Operating Procedures for clinical chemistry. Total Protein – Biuret method. Ginebra. Suiza. 2011.
- Ozeki T, Yasuzawa Y, Katsuyama H, Takashima Y, Kasai T, Eguchi T, Kakiuchi H, Yuasa H, Okada H. Design of Rapidly Disintegrating Oral Tablets Using Acid-Treated Yeast Cell Wall: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*. 2003; 4 (4): 1-4
- Pachaly P. Simple Thin-layer Chromatographic Identification of Active Ingredients in Essential Drugs. Munich: *Gesundheitshilfe Dritte Welt*; 1994. p. 25-6.
- Patel, JA; y Shah, US. Hepatoprotective activity of *Piper longum* traditional milk extract on carbon tetrachloride induced liver toxicity in Wistar rats. *BLACPMA* 2009. 8 (2), 121 – 129
- Patel S, Mohan KA, Kumar BA. Effect of particle size and compression force on compaction behavior and derived mathematical parameters of compressibility. *Pham Research*. 2007; 24(1): 111-123
- Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum J y Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 3894-3898
- Pedrielli P y Skibsted LH. Antioxidant Synergy and Regeneration Effect of Quercetin, (-)Epicatechin, and (+)-Catechin on α -Tocopherol in Homogeneous Solutions of Peroxidating Methyl Linoleate. *Agric. Food Chem*. 2002; 50 (24): 7138–7144

- Pimple BP, Kadam PV, Badgujar NS, Bafna AR, Patil MJ. Protective effect of *Tamarindus indica* L against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Pharm Sci*. 2007; 69(6): 827-831
- Pino JA, Escalona-Arranz JC, Licea-Jiménez I, Pérez-Rosés R, Agüero-Agüero J. Leaf oil of *Tamarindus indica* L. *JEOR*, 2002, 14(3): 187-188.
- PNT. Cuarentena de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código 422005. TOXIMED. 2007
- PNT. Ensayo de irritabilidad de la mucosa oral. Código 422031. TOXIMED. 2007
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agr. Food Chem*. 2000; 48 (1): 3396–3402.
- Ramos A, Visozo A, Piloto J, García A, Rodríguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in cubans medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003; 87(2-3):241-6
- Recknagel RG. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 1967;19:145-208.
- Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity *status quo* and future prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 1983 (4):129-31.
- Repetto MR; Toxicología Experimental. 2da Ed. Barcelona: Científico Médica, España, 1988
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E: role of a Janus molecule. *FASEB J*. 2001; 15: 2314-2325
- Rick TJ. New drug development design, methodology, and analysis. John Wiley & Sons, Inc., NJ. USA. 2007. 270p
- Roca G. Medicina Interna. Editorial Ciencias Médicas. Ciudad de la Habana Cuba. 2007. CD-Rom.
- Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba, Ed. Científico Técnica, La Habana, Cuba. 1988.
- Romero JM, Lorenzo MG y Padrón ML. Estudio de dosis límite del extracto acuoso de *Portulaca oleracea* L. *Rev Cub Farmacia*. 2002; 36(SI): 1-3
- Rowe RC (Editor). Handbook of Pharmaceutical Excipient. Pharmaceutical Press & American Pharmacists Association. USA. 2009. 888p

- Saraswat B, Visen PK, Patnaik GK, Dhawan BN. Anticholestatic effect of picroliv, active hepatoprotective principle of *Picrorhiza kurrooa*, against carbon tetrachloride induced cholestatis. *Indian J Exp Biol.* 1993; 31:316-8.
- Sari M, Biondi DM, Kaâbeche M, Mandalari G, D'Arrigo M, Bisignano G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour Frag. J.* 2006; 21: 890–898.
- Saha P, Mazumder K, Haldar PK, Bala A, Kar B, Naskar S. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cucurbita maxima* aerial parts. *J H Med and Toxicology* . 2011; 5(1):17-22
- Sbarbaty, NN; Estabilidad de medicamentos. ECIMED. La Habana. Cuba. 2005
- Svensen AB y Scheffer JC. Natural product in therapy. Prospecta, goal and means in modern research. *Pharm. Weekly.* 1992; 4: 93-97.
- SCSEDR (Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington. 2000.
- Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Secretaría Ejecutiva Convenio Andrés Bello. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 2000. 246p
- Sharma NS y Das Gupta G. Formulation of Fast-Dissolving Tablets of Promethazine Theoclate Shailesh. *Trop. J. Pharm. Res.* 2010; 9 (5): 489-497
- Shekunov BY, Chattopadhyay P, Tong HH, Chow HL. Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications. *Pharm Research.* 2007; 24(2): 203-227
- Sies H y Stahl W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: 1315-1321
- Sonbolia A, Salehib P, Reza KM, y Nejad EM. Antibacterial and Antioxidant Activity and Essential Oil Composition of *Grammosciadium scabridum* Boiss. *Iran. Z. Naturforsch.* 2005; 60: 534 -538
- Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología, Nutrición y Pediatría. Tratamiento en Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. 2da Ed. Madrid. España. 2008. 745p

- Sreelatha S, Padma PR, Umadevi M. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47, 702–708.
- Souza BA. Farmacología de Plantas Mediciniais. Rio Janeiro. Brasil. 2003.
- Souza TP, Gómez JL, Martínez R, Petrovick PR. Compression behavior of formulations from *Phyllanthus niruri* spray dried extract. *Pharmazie.* 2006; 61: 213-217.
- Souza TP, Gómez JL, Martínez R, Petrovick PR. Development of granules from *Phyllanthus niruri* spray dry extract. *BJPS.* 2009; 45(4): 669-675
- Stenz L, François P, Fischer A, Huyghe A, Tangomo M, Hernandez D, et al. Impact of oleic acid (cis-9-octadecenoic acid) on bacterial viability and biofilm production in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* 2008; 287: 149–155.
- Surendra H, Bodakhe AR. Hepatoprotective Properties of *Bauhinia variegata* Bark Extract. *Yakugaku zasshi.* 2007, 127(9): 1503-1507
- Takate SB, Pokharkar RD, Chopade VV, Gite VN. Hepato-Protective activity of the aqueous extract of *Launaea intybacea (Jacq)Beauv* against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Albino Rats. *J. Pharm. Sci. Technol.* 2010; 2 (7): 247-251
- Takeoka GR, Dao LT. Antioxidant constituent of almond (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb.] hulls. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 496-501.
- Touriño S, Lizárraga D, Carreras A, Lorenzo S, Ugartondo V, Mitjans M, Pilar MV, Juliá L, Cascante M y Torres JL. Highly Galloylated Tannin Fractions from Witch Hazel (*Hamamelis Wirginiana*) Bark: Electron Transfer Capacity, In Vitro Antioxidant Activity, and Effects on Skin-Related Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21, 696–704
- TOXIMED. Informe final de estudio preclínico toxicológico. Evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral del hámster sirio dorado producida por el extracto fluido de las hojas de *Tamarindus indica* L (Tamarindo). Santiago de Cuba. 2009^a.
- TOXIMED Informe final de estudio preclínico toxicológico. Evaluación de Toxicidad aguda oral por el método de las clases de toxicidad del extracto fluido de las

- hojas de *Tamarindus indica* L (Tamarindo) en ratas Sprague Dawley. Santiago de Cuba. 2009^b.
- Troncoso L y Guija E. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *An Fac Med Lima*. 2007; 68(4): 333 – 343
- United States Pharmacopeia. The official compendia of standar. Version 1.0. For Windows. Arabswell. USA. 2007. CD-ROM.
- Valko M, Leibfritz D, Monco J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem & Cell Biology*. 2007; 39 (1),44-84.
- Vega GE. Quince primeras causas de muerte en Cuba: Impacto y reserva potencial, de estos problemas de salud, en la Esperanza de Vida. Red Cubana de Gerontología y Geriatria. 2011. Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/gericuba/temas.php?idv=11049>. Fecha de acceso: 14/09/2011
- Venardos K, Harrison G, Headrick J y Perkins A. Effects of dietary selenium on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activity and recovery from cardiac ischemia–reperfusion. *J Trace Elem Medicine and Biology*. 2004; 18(1): 81-88
- Vila JJ. (Editor) Operaciones básicas de Tecnología Farmacéutica. Editorial Acribia. Madrid. España. 2000
- Viña J, Lloret A, Orti R, Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol. Aspects Med*. 2004; 25: 117-23
- Virág L, Szabó É, Gergely P, SzabóC. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters*. 2003; 140-141 113-124.
- Vivancos M y Moreno JJ. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biol. Med*. 2005; 39(1): 91-97
- Weng XC, y Gordon MH. Antioxidant synergy between phosphatidyl ethanolamine and α -tocopherylquinone. *Food Chemistry*. 1993; 48(2): 165-168

- Won SR, Hong MJ, Kim YM, Li CY, Kim JW, Rhee HI. Oleic acid: an efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Letter*. 2007; 581: 4999–5002.
- Yeon HK, Juhyun P, Kwan HL, Dong UL, Jong HK, Yeong SK, Sun ML. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Toxicology*. 2011; 282: 104–111
- Yossef HE, Abeer A. K, Mahran ZM. Hepatoprotective activity and antioxidant effects of El Nabka (*Zizyphus spina-christi*) fruits on rats hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride. *Nature and Science*. 2011; 9(2): 1-7
- Yoshioka S y Stella JV. Stability of Drugs and Dosage Forms. Kluwer Academic Publishers. NY. USA. 2002
- York, P., *J. Pharm. Sci.*, 64:1216 en Lieberman H y Lachman L. Pharmaceutical Dosage Forms. Tablets. Marcel Dekker. New Cork. USA. 1981. (2): 300p
- Ysimi YC. Effects of the diluent type on the compressional characteristics of the mixed stem bark extract of *Anogeissus leiocarpus* and *Prosopis africana* tablet formulation, *Acta Pharm*. 2003; 53: 49–56.
- Zangar RC, Benson JM, Burnett VL, Springer DL. Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chem Biol Interact*. 2000; 125: 233–243.
- Zhai Z, Haney D, Wu L, Solco A, Murphy PA, Wurtele ES, et al. Alcohol extracts of *Echinacea* inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by macrophages in vitro. *Food Agric. Immunol*. 2007; 18(3-4): 221–236.
- Zhao N and Augsburger LL. Functionality Comparison of 3 Classes of Superdisintegrants in Promoting Aspirin Tablet Disintegration and Dissolution. *AAPS PharmSciTech*. 2005; 6 (4): 634-640

ANEXO I. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA

		INFORME DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE MATERIA PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO		Código: RI 01.148 T	
Nombre del Cliente:		Nombre del Producto: <i>Tamoxifen</i>		Código ó Lote:	
Fecha de Entrada: <i>15/12/08</i>		Fecha de Siembra: <i>16/12/08</i>		Categoría: <i>Producto terminado</i>	
Ensayo: Conteo microbiano		Resultados: <i>CB < 10 ufc/g</i> <i>CH < 10 ufc/g</i> <i>no presencia</i> <i>no presencia</i> <i>no presencia</i> <i>no presencia</i>		Límites: Bacterias: No más de 10^3 UFC x g Hongos: No más de 10^2 UFC x g No Pseudomonas aeruginosa No Staphylococcus aureus No Enterobacterias No Candida	
Observaciones: —					
Bibliografía: INS 01.148 T Análisis microbiológico a materias primas y producto terminado no estéril por el método de placa vertida					
Decisión del Laboratorio: <i>Conforme</i>		Técnicos: <i>Ricardo Ricci</i>		Fecha de Salida:	
Responsable del Laboratorio (firma y cargo): <i>Spall Espinaldo Principal</i>					



INFORME DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE
MATERIA PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO

Código: RI 01.148 T

Nombre del Cliente: <i>Xuuruich de Oriente</i>	Nombre del Producto: <i>Tamoxifen 600 mg</i>	Código ó Lote: _____
Fecha de Entrada: <i>5/7/10</i>	Fecha de Salida: <i>3/9/10</i>	Categoría: <i>P. Terminada</i>
Ensayo: Conteo microbiano	Resultados: <i>CB < 10 ufc/g</i> <i>CH < 10 ufc/g</i> <i>No presencia</i> <i>No presencia</i> <i>No presencia</i> <i>No presencia</i>	Limites: Bacterias: No más de 10^3 UFC X g Hongos: No más de 10^2 UFC X g No Pseudomonas aeruginosa No Staphylococcus aureus No Enterobacteria No Candida
Observaciones: _____		
Bibliografía: INS 01.148 T Análisis microbiológico a materias primas y productos terminados no estéril por el método de placa vertida		
Decisión del Laboratorio: <i>Conforme</i>	Técnicos: <i>Revisar Reir</i>	Fecha de Salida: <i>10/9/10</i>
Responsable del Laboratorio (firma y cargo): <i>Spinel Espinosa S. S. S. S.</i>		



INFORME DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE MATERIA PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO

Código: RI 01.148 T

Nombre del Cliente:	Nombre del Producto: <i>Tamoxifeno</i>	Código ó Lote:
Fecha de Entrada: <i>29/6/10</i>	Fecha de Siembra: <i>29/6/10</i>	Categoría: <i>Producto Terminado</i>
Ensayo: Conteo microbiano	Resultados: <i>CD 4.000 ufc/g</i> <i>CD 4.000 ufc/g</i> <i>no presencia</i> <i>no presencia</i> <i>no presencia</i> <i>no presencia</i>	Límites: Bacterias: No más de 10^3 UFC x g Hongos: No más de 10^2 UFC x g No Pseudomonas aeruginosa No Staphylococcus aureus No Enterobacterias No Candida
Observaciones: —		
Bibliografía: INS 01.148 T Análisis microbiológico a materias primas y producto terminado no estéril por el método de placa vertida		
Decisión del Laboratorio: <i>Conforme</i>	Técnicos: <i>Luz Daimé Sáenz</i>	Fecha de Salida: <i>30/6/10</i>
Responsable del Laboratorio (firma y cargo): <i>Reporta Especialista Principal</i>		

BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

PUBLICACIONES EN EL TEMA DE TESIS

1. **Rodríguez-Amado JR**, Escalona AJ, Lafourcade PA, Rodríguez RR, Batista RA. Validación del método de cuantificación de polifenoles en el extracto fluido de *Tamarindus indica* L. *Rev Cub Química*. 2011a, 23(1): 42-50
2. **Rodríguez-Amado JR**, Escalona AJ, Lafourcade PA, Rodríguez RR, Batista RA. Estudio de estabilidad química acelerada de las tabletas de *Tamarindus indica* L. *Rev Cub Química*. 2011b, 23(1): 9-16
3. **Rodríguez-Amado JR**, Lafourcade-Prada A, Escalona JC. Formulación de comprimidos de tamarindo por el método de granulación húmeda. *Rev. Cub. Farmacia* 2011; 45(3): 414-422
4. **Rodríguez-Amado JR**, Lafourcade PA, Escalona JC; Pérez RR, Iraizoz CA. Physicomechanical and compaction characterization of tablets obtained from a natural dry extracts. *Tecnología Química*. 2011; 31 (2): 75-81.
5. **Rodríguez-Amado JR**, Lafourcade-Prada A, Escalona-Arranz JC, Iraizoz-Colarte A. Preformulación de tabletas de *Tamarindus indica* L. *Rev. Cub. Farmacia*. 2011; 45(4): 553-562
6. **Rodríguez-Amado JR**, Pérez RR, Escalona-AJC; Lafourcade PA, Sierra GG. Standardization of the quality control parameters of the *Tamarindus indica* L. soft extract. *Rev Cub Plantas Medicinales*. 2012: 17(1)
7. Escalona AJC, **Rodríguez-Amado, JR**, Pérez RR, Cañizares LJ, Sierra GG, Morris QJ, Licea JI. Metabolites extracction optimization of *Tamarindus indica* L. leaves. *BLACPMA*. 2011, 10 (4): 369 - 378
8. Escalona-Arranz JC; Pérez-Rosés R; Licea-Jiménez I; **Rodríguez-Amado JR**; Argota-Coello H, Cañizares-Lay J, Morris-Quevedo HJ, Sierra-González GV. Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. leaves. *Rev. Cub. Química*. 2010; XII (3): 65-71.
9. Escalona-Arranz JC, Pérez-Rosés R, Urdaneta I, Camacho M, **Rodríguez-Amado JR**, Licea-Jiménez I. Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. *Pharm Magazine*. 2010; 6(23): 242-247.

ARTÍCULOS ACEPTADOS PARA PUBLICACIÓN

10. **Rodríguez-Amado JR**, Lafourcade PA, Escalona AJC, Pérez RR, Iraizoz CA. Estabilidad en estante de tabletas de las hojas de *Tamarindus indica* L. *Rev Cub Farmacia*.

EN ARBITRAJE ACTUALMENTE

11. **Rodríguez-Amado JR**, Lafourcade PA, Escalona AJC, Pérez RR. Obtaining of a *Tamarindus indica* L dry extract for tablets preparation. *BLACMA*. Julio 2011
12. **Rodríguez-Amado JR**, Lafourcade PA, Escalona AJC, Pérez RR, Iraizoz CA. Development and optimization of a novel antioxidant vegetal extract tablets using D-optimal mixture design. *BJPS*. Julio 2011

MEMORIAS PRESENTADAS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

1. XX Conferencia Internacional de Química. Hotel Meliá Santiago de Cuba. Cuba. 6-9 de Diciembre 2011. Physicomechanical and compaction characterization of tablets obtained from a natural dry extracts.
2. 7^{ma} Reunión internacional de investigación en Productos Naturales “Dr. Pedro Joseph Nathan”. Morelia, Michoacán, México. 18- 20 de mayo. 2011. Trabajo presentado: Desarrollo tecnológico y evaluación toxico-farmacológica de formas farmacéuticas sólidas a partir de extractos de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L.
2. Congreso Internacional: MNT y Complejidad: Fecha 8-12 de nov de 2010. Camaguey. Cuba. Trabajo presentado: Estudio de estabilidad físico mecánica, química y biofarmacéutica de tabletas de *Tamarindus indica* L.
3. Expo Cumbre Mundial de Diabetes, Obesidad, Nutrición y problemas cardiovasculares. WTC. Ciudad México, DF. México. Abril de 2010. Trabajo presentado: El *Tamarindus indica* L una especie con potencialidad hipolipemiante para el tratamiento de la obesidad.
4. ProdMedNatur 2010. VII Congreso Continental, IV Congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y Medicinas Naturales. Palacio Convenciones. Habana. 2010. Trabajo

presentado: "Obtención y caracterización de un granulado antioxidante a partir de extractos de la especie *Tamarindus indica* L".

5. XVIII Congreso Italo-Latinoamericano de ETNOMEDICINA Juan Tomás Roig y Mesa 2009. VII Taller internacional de química de los productos naturales. Palacio de las Convenciones. Ciudad Habana. Cuba. 14-18 Septiembre de 2009. Trabajo presentado: Presentación de un nuevo comprimido natural antioxidante a partir del *Tamarindus indica* L.
6. FAPRONATURA 2009. Second International Symposia on Pharmacology of Natural Products. 2009. Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves".
7. XIX Conferencia Internacional de Química. Centro de Convenciones Heredia. Santiago de Cuba. Cuba. Diciembre de 2008. Chemometric Modeling and technological development of a natural vegetal extracts tablets.

RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

- 1- Desarrollo tecnológico y evaluación toxico farmacológica de formas farmacéuticas sólidas a partir de extractos de las hojas de la especie *tamarindus indica* l. *Rev. Latinoamer. Quím. 2011, 38(SI):19*
- 2- Desarrollo y optimización de un nuevo comprimido vegetal antioxidante utilizando un diseño de mezcla D-optimal. *Rev. Latinoamer. Quím. 2011, 38(SI): 77*
- 3- Estandarización de un nuevo extracto natural antioxidante y hepatoprotector para formulaciones farmacéuticas. *Rev. Latinoamer. Quím. 2011, 38(SI): 96*
- 4- Obtención y caracterización físico mecánica de un nuevo extracto seco vegetal para la preparación de formas farmacéuticas sólidas. *Rev. Latinoamer. Quím. 2011, 38(SI): 124*
- 5- Phytochemical characterization and antioxidant activity of *Tamarindus indica* l. leaves. *Rev. Latinoamer. Quím. 2011, 38(SI): 125*

TRABAJOS DE DIPLOMA DIRIGIDOS EN LA TEMÁTICA

1. "Establecimiento y validación de un método espectrofotométrico para la cuantificación de polifenoles totales en el extracto fluido de *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)

2. "Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)
3. "Evaluación de la capacidad extractiva de diferentes soluciones hidroalcohólicas en las hojas de la especie *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)
4. "Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas del *Tamarindus indica* L. en diferentes estados fisiológicos de la planta." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2008)
5. "Evaluación del poder reductor de extractos de hojas del *Tamarindus indica* L. en diferentes estados fisiológicos de la especie." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2008).
6. Evaluación de la capacidad de acomplejante de Fe^{2+} por extractos de hojas del *Tamarindus indica* L. (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2009)
7. Formulación de tabletas a partir de extractos de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L. (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)
8. Formulación de cápsulas duras a partir del extracto blando de tamarindo. (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2011)

TESIS DE MAESTRÍA EN EL TEMA

1. Obtención y caracterización de un extracto seco de *Tamarindus indica* L. para compresión directa. IFAL-UH. Jesús Rafael Rodríguez Amado. 2009. (Autor)
2. Formulación de comprimidos a partir de extractos de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L., por el método de granulación húmeda. IFAL. UH. 2009. Maestrante: Lic. Ariadna Lafourcade Prada. Departamento de Farmacia. Universidad de Oriente. IFAL. Universidad de la Habana. (Cotutor)

3. Formulación y evaluación de la estabilidad físico mecánica y química de cápsulas duras de tamarindo. IFAL. Universidad de la Habana. 2011. Maestrante: Lic. Liana Pérez Rondón. Departamento de Farmacia. Universidad de Oriente. (Tutor)

DISTINCIONES Y RECONOCIMIENTOS

1. Logro científico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (2007). “Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de extractos de *Tamarindus indica* L.”
2. Premio Relevante en el Forum Nacional Estudiantil de Ciencia y Técnica. (2008). “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.” (Coautor, Tutor)
3. Coautor del resultado al Logro científico ya aplicado de mayor aporte social de la Universidad de Oriente (2010). “Implementación de servicios farmacéuticos y Medicina Complementaria en función del desarrollo social local y la calidad de vida.”
4. Distinción por la Contribución al Trabajo de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente, en sus 10 años de creación. 2011
5. Mejor resultado de investigación del Departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente. Concurso de Investigadores de la ANIR en la Universidad de Oriente. 2011.