

UNIVERSIDAD DE LA HABANA



**Instituto de Farmacia y Alimentos
Departamento de Tecnología y Control de los Medicamentos**

**Un ingrediente activo con acción antihelmíntica, a
partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch:
Estudios analíticos y de preformulación**



**Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias
Farmacéuticas**

Autor: MSc. María Elisa Jorge Rodríguez.

**Tutores: Dra. Hilda María González San Miguel
Dr. Antonio Iraizoz Colarte
Dra. Gretel Villanueva Ramos**

**La Habana
2006**

SÍNTESIS

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos de los estudios analíticos y de preformulación realizados en un sólido pulverulento obtenido a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch mediante un nuevo proceso tecnológico. El ingrediente activo obtenido presenta propiedades físicas, químicas y tecnológicas que permiten su utilización en la elaboración de formas farmacéuticas con acción antihelmíntica. Se evaluó el procedimiento tradicional para la obtención de polvo a partir de las semillas en comparación con una **nueva metodología** que permite el desarrollo de un proceso limpio en el cual se puede disponer de dos productos colaterales (aceite y testa) de interés farmacéutico y para la nutrición animal, respectivamente. El polvo obtenido tiene 0,8% de aminoácidos que reaccionan de forma similar a la Cucurbitita con la ninhidrina, lo que constituye un notable incremento en el contenido de metabolitos activos obtenidos por la nueva metodología con respecto al polvo obtenido por métodos convencionales.

Los estudios analíticos realizados permitieron proponer el análisis microscópico, las reacciones colorimétricas de Foling y ninhidrina y la Cromatografía en Capa Delgada como ensayos cualitativos para la identificación del polvo; como ensayos específicos se determinó el límite superior de especificación de los ensayos pérdida por desecación, cenizas totales y cenizas insolubles en agua, obteniéndose valores que se corresponden con los reportados, en farmacopeas vigentes, para ingredientes activos de origen vegetal. Una técnica colorimétrica, utilizando la reacción de ninhidrina, se empleó como ensayo cuantitativo, realizando la evaluación del contenido de aminoácidos presentes en el polvo en base a asparagina. Se establecieron como condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica una temperatura de 60°C, tiempo de calentamiento 40 minutos y tiempo de lectura 10 minutos y se validó la misma comprobándose su fiabilidad para los objetivos propuestos. Estos resultados permitieron proponer **la monografía** para el control de la calidad del sólido pulverulento como ingrediente activo. Dicha monografía, novedosa al elaborarse para este fármaco, se estructuró acorde con las normativas internacionales y se aplicó en la comparación de los polvos obtenidos por el método clásico y el método propuesto en esta Tesis.

Los **estudios de preformulación** aplicados al sólido pulverulento, realizados por primera vez en Cuba, y sin referencias en la bibliografía disponible, demostraron que el polvo obtenido en el presente trabajo posee ligera higroscopicidad, escasa fluidez, es compatible con los excipientes evaluados y es estable en el tiempo que abarcó el estudio. Estos resultados, unidos a los descritos anteriormente, permitirán la posterior formulación de una nueva forma farmacéutica con acción antihelmíntica con requisitos tecnológicos establecidos, presentación estética adecuada y ensayos de control de calidad que lo hagan más fiable.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	5
1.1. Consideraciones generales acerca del uso de las plantas medicinales	5
1.2. Sólidos pulverulentos (polvos)	7
1.2.1. Operaciones tecnológicas con sólidos pulverulentos	7
1.2.2. Caracterización físico-química de los sólidos pulverulentos	9
1.2.3. Caracterización físico-química del aceite	10
1.3. Estudios analíticos en plantas medicinales	11
1.4. Estudios de preformulación desarrollados en plantas medicinales	16
1.5. Las Semillas de Cucurbita spp. Estudios realizados en el campo farmacéutico	21
1.5.1. Características botánicas y usos de la planta	21
1.5.2. Estudios fitoquímicos de las semillas de Cucurbita	23
1.5.3. Propiedades farmacológicas y toxicológicas de la Cucurbita spp.	25
1.5.4. Estudios analíticos aplicados a la Cucurbitina	27
1.6. Consideraciones finales del estudio bibliográfico	28
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. Material vegetal, equipos y reactivos	30
2.2. Métodos de obtención del polvo a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch	31
2.3. Estudios analíticos para establecer la monografía de control de calidad del sólido pulverulento	33
2.3.1. Ensayos cualitativos de identificación	33
2.3.2. Ensayos específicos. Determinación de los límites de especificación	34
2.3.3. Ensayo cuantitativo. Espectrofotometría UV-VIS, utilizando la reacción de ninhidrina	36
2.3.3.1. Definición de las condiciones experimentales para la técnica.	36
2.3.3.2. Validación de la técnica colorimétrica.	37
2.3.4. Establecimiento de la monografía analítica para el control de la calidad del polvo. Aplicación en la comparación del polvo obtenido en este trabajo y el polvo que actualmente se comercializa en Cuba	38
2.4. Definición de las condiciones experimentales para la utilización de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación cuantitativa de la Cucurbitina	39
2.4.1. Aislamiento y evaluación de la Cucurbitina para su utilización como patrón analítico	39
2.4.2. Puesta a punto de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina	41
2.5. Procedimientos para la validación de las técnicas espectrofotométrica UV-VIS y de HPLC	42
2.6. Ensayos físico-químicos para los estudios de preformulación del sólido pulverulento	44
2.6.1. Medición de la distribución de tamaño de partículas	44
2.6.2. Determinación de la humedad residual del polvo	44
2.6.3. Estudios de higroscopicidad	44
2.6.4. Determinación de la fluidez del polvo	45
2.6.5. Estudio de compatibilidad del sólido pulverulento y la resina acrílica	48
2.6.6. Estudio de estabilidad inicial	48
2.7. Evaluación preliminar de los subproductos obtenidos en el método II.	48
2.7.1. Determinación de las propiedades físico-químicas (índices de calidad cualitativo) del aceite obtenido a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch	48
2.7.2. Análisis bromatológico del subproducto sólido (testa) con vistas a su uso en la alimentación animal.	50
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1. Métodos de obtención del polvo a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch	51
3.1.1. Establecimiento de condiciones para el desarrollo de los métodos de obtención del polvo	51

3.1.2. Comparación de los métodos empleados en la obtención del polvo	55
3.2. Estudios analíticos para establecer los procedimientos de control de calidad del polvo obtenidos a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch	57
3.2.1. Ensayos cualitativos de identificación	57
3.2.2. Determinación de los límites de especificación de las pruebas específicas	61
3.2.3. Evaluación de la técnica espectrofotométrica UV-VIS para su uso como ensayo cuantitativo	62
3.2.3.1. Establecimiento de las condiciones	62
3.2.3.2. Validación de la técnica colorimétrica	67
3.2.4. Descripción y aplicación de la monografía al control de calidad del polvo de Cucurbita moschata Duch. Comparación con el polvo que se comercializa en Cuba	70
3.3. Estudios analíticos para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina en los estudios de estabilidad.	71
3.3.1. Aislamiento y evaluación de la Cucurbitina para su uso como patrón analítico en los estudios de estabilidad	71
3.3.2. Validación de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina	74
3.4. Ensayos físico-químicos realizados para los estudios de preformulación del polvo obtenido a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch, por el método II, para su uso como ingrediente activo en formas farmacéuticas sólidas	80
3.4.1. Medición de la distribución de tamaño de partícula	80
3.4.2. Determinación de la humedad residual del polvo	80
3.4.3. Estudios de Higroscopicidad	81
3.4.4. Determinación de la Fluidez del polvo	82
3.4.5. Estudios de compatibilidad	85
3.4.6. Estudios de estabilidad inicial	89
3.5. Evaluación preliminar de los subproductos obtenidos en el método II.	90
3.5.1. Evaluación físico-química del aceite de las semillas de Cucurbita moschata Duch	90
3.5.2. Análisis Bromatológico del subproducto sólido (testa y almendra) con vistas a su uso en la alimentación animal	92
CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	-

INTRODUCCIÓN

A lo largo de toda la historia de la humanidad, los diferentes pueblos han utilizado medicamentos naturales que encontraban allí donde vivían. El conocimiento de ciertas plantas y remedios tradicionales data de muchos siglos, sus efectos han sido experimentados y confirmados por multitud de generaciones, por lo que el empleo de éstos, constituye una parte importante de la cultura universal que ha acumulado la humanidad, *Velázquez G., 1996.*

En numerosos países subdesarrollados, la mayoría de la población se sirve de medicamentos tradicionales que la "ciencia moderna" no siempre ha sabido estudiar, reconocer y apreciar. Hoy, las grandes industrias farmacéuticas a nivel mundial dependen en gran medida de las plantas medicinales, numerosos medicamentos modernos provienen de plantas utilizadas desde hace siglos. La búsqueda de compuestos de origen vegetal, biológicamente activos, es una tarea en la cual se encuentran enfrascados muchos investigadores. Esto se debe no sólo a la ventaja de obtener nuevas drogas, sino también, a que permite encontrar prototipos estructurales activos que mediante técnicas semi-sintéticas, pueden lograr derivados menos tóxicos y/o más eficaces, *Zhang X, 1998.*

Ha quedado ya superada la etapa en que se absolutizaba la eficacia excepcional de los productos de síntesis, hasta el punto de echar en el olvido las posibilidades que la naturaleza ofrece. Ahora sabemos que la biosíntesis que se opera en las plantas, sobre la base de la asimilación de moléculas simples en sistemas infinitamente complejos, supera por sus posibilidades a todas las fábricas químicas contemporáneas, *Robineau L., 1992.*

La Organización Mundial de la Salud (OMS), 1991, define las plantas medicinales como toda especie vegetal, en la que toda o una parte está dotada de actividad farmacológica y recomienda el uso de la medicina natural en los países en vías de desarrollo ante la imposibilidad de acceder, por razones de tipo económico, al arsenal terapéutico disponible en los países desarrollados.

Lo anterior, unido al nivel actual de la farmacología y de la tecnología farmacéutica, debe permitir una aproximación científica al problema, que abarca desde la selección de productos de eficacia contrastada, hasta el diseño de las formas farmacéuticas con buena calidad, tanto desde el punto de vista tecnológico como biofarmacéutico, para su administración. En la medida en que se racionalice y se normalice el uso de estos medicamentos, se avanzará en la cobertura terapéutica en estos países, *Díaz LM., 1995.*

Los efectos de la fitoterapia son generalmente atribuidos a la planta como un todo. Sin embargo, el término plantas no es más que el material vegetal crudo a partir del cual los ingredientes activos son colectados por procedimientos especiales. La mayoría de las preparaciones fitoterapéuticas, en contraste con las drogas sintéticas, contienen una mezcla compleja de principios activos que es difícil caracterizar química y biológicamente, por lo que nunca la calidad de las preparaciones medicinales a partir de plantas suele ser garantizada si el material crudo, la forma de preparación y el producto final no están bien definidos por el manufacturero, *Meier B., 2002.*

En Cuba, el uso de las plantas medicinales, como recurso terapéutico, ha adquirido en los últimos años una relevancia fundamental por su probada efectividad e inocuidad, ya que constituye la base para la elaboración de sistemas de medicina alternativa, como fuente de materia prima para la industria farmacéutica, en la sustitución de materia prima de importación para la elaboración de medicamentos y como arma terapéutica en los sistemas médicos y fitoterapéuticos tradicionales, *Areces A., 2000.*

En nuestro país, de forma similar a lo que ocurre en la mayoría de los países, las plantas medicinales se encuentran incluidas en la categoría de medicamentos. Por tanto, se hace necesario que todo fitopreparado, empleado con fines terapéuticos (preventivo, curativo, sintomático), sea considerado un medicamento al que hay que exigir el cumplimiento de los parámetros de: calidad, seguridad y eficacia. Su uso racional (indicaciones, dosificación, posología, consejo sanitario), conjuntamente con los controles preestablecidos en cuanto a calidad y seguridad, son los factores determinantes de la eficacia terapéutica en los preparados elaborados a partir de plantas, *Navarro C., 2000.*

El Ministerio de Salud Pública (MINSAP), en coordinación con centros de investigación y universidades del País, estimula y dirige el desarrollo de investigaciones sobre plantas medicinales, con el objetivo de obtener formas farmacéuticas que cumplan con los requerimientos tecnológicos establecidos para lograr preparados biodisponibles. Esta es una alternativa que se sigue en el tratamiento de diversas enfermedades entre las que cabe señalar las infestaciones parasitarias, que constituyen un peligro de alcance mundial para la salud, fundamentalmente en algunos países tropicales, donde alcanzan el 80% de la población, destacándose la helmintiasis como una de las enfermedades predominantes en el mundo, *Flores J., 2004.*

Dentro de las plantas que se han utilizado a nivel mundial, por su acción antihelmíntica se destacan las semillas de *Cucurbita* spp., cuya acción ha sido demostrada en múltiples trabajos (*Duvían G., 1953; Shiao S., 1962; Rivastava A. y col., 1967; González E., 1974; Fiang S., 1982; Elisha E., 1997; Díaz Obregón D. y col., 2004*). Sin embargo, las farmacopeas vigentes no reportan un ingrediente activo a partir de esta planta cuya

acción antiparasitaria se debe a la presencia en su almendra, de un aminoácido pirrolidínico llamado Cucurbitina, que no se comercializa, Sun T., 1961; Mamoun O. y col., 1995; André P, 1997.

A partir de 1992, la utilización de las semillas de calabaza en Cuba, pasó de la medicina tradicional a ser expandido por los laboratorios de fitofármacos de todo el país, en forma de papelillos, según la *Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos, 1992*. Sin embargo, a pesar de haberse iniciado su comercialización, el método de obtención de este producto no incluye la separación del aceite y la testa del polvo obtenido de la almendra, portador fundamental de los metabolitos activos. Por otra parte, no existen técnicas analíticas ni estudios tecnológicos, reportados en la bibliografía, que garanticen su control de calidad y una formulación óptima, respectivamente. Todo lo cual motivó que los papelillos de polvo de semillas de calabaza perdieran, casi totalmente, la demanda en el mercado, a pesar de considerarse necesarios para combatir las enfermedades parasitarias y enriquecer la terapia antihelmíntica en el País, actualmente limitada.

Constituye, por tanto, el **problema científico** de este estudio; que, la forma en que se prescribe, en Cuba, el polvo obtenido de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch no posee estudios analíticos y de preformulación que la fundamenten; carece de monografía para su control de calidad, lo que unido a su presentación (papelillos) dificulta la aceptación popular y, lógicamente, su comercialización.

Por ello, y en aras de contribuir con el Programa de Medicina Verde del País, este trabajo científico parte de la **hipótesis** de que es factible obtener, a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, un nuevo producto, desgrasado y decorticado, con posibilidades de ser utilizado como ingrediente activo en la elaboración de formas farmacéuticas con acción antihelmíntica; Para fundamentar dicha hipótesis se plantea el **objetivo general** siguiente:

Obtener un nuevo producto, desgrasado y decorticado, a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch; y evaluarlo como ingrediente activo de formas farmacéuticas, con actividad antihelmíntica.

A partir de este objetivo general se precisan los siguientes **objetivos específicos**:

- Definir un nuevo proceso tecnológico para la obtención de un polvo, desgrasado y decorticado, a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch.
- Comparar el método de obtención del polvo, propuesto en el presente trabajo, con el método utilizado actualmente en los laboratorios de fitofármacos del País.

- Evaluar ensayos cualitativos y específicos para ser incluidos en la monografía de control de la calidad del polvo.
- Realizar estudios analíticos para establecer las condiciones óptimas de aplicación de la reacción de ninhidrina en la determinación de aminoácidos en el polvo.
- Validar las técnicas de colorimetría y de HPLC, empleando la reacción de Ninhidrina, para su aplicación en la determinación cuantitativa de aminoácidos totales y en los estudios de estabilidad del polvo, respectivamente.
- Realizar estudios de preformulación del polvo, obtenido por el método II, para su uso en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas.
- Evaluar cualitativamente el aceite obtenido como producto colateral del método II para recomendar su uso con fines farmacéuticos.

Los **aspectos novedosos** y **aportes más significativos** de este trabajo se pueden resumir en que:

Se desarrolla un proceso limpio de obtención del polvo de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, el cual incluye procedimientos de desgrase y decortado, que proporciona un producto de mayor calidad para su aplicación como antihelmíntico. A partir del desarrollo y validación de diferentes procedimientos analíticos se propone la monografía analítica para garantizar el control de la calidad de dicho polvo, como materia prima, aspecto no reportado en las farmacopeas actuales. Se exponen, por primera vez en Cuba y sin antecedentes en la literatura científica consultada, resultados de estudios de preformulación del polvo que servirán de base para la futura formulación de formas farmacéuticas con acción antihelmíntica.

CAPÍTULO I. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

1.1. Consideraciones generales acerca del uso de las plantas medicinales

Desde los albores de la humanidad, individuos pertenecientes a distintas tribus o pueblos descubrieron, quizás en forma paralela, que algunas plantas eran integrantes de la dieta, mientras que otras poseían propiedades curativas. Estos fueron los primeros pasos de ensayo y error, por medio de los cuales el hombre primitivo adquirió una serie de conocimientos sobre aquellas especies vegetales que eran susceptibles de ser empleadas con fines terapéuticos. *Navarro C., 1994.*

Los conocimientos, transmitidos durante una larga parte de la historia de la humanidad, en forma oral, quedaron posteriormente recogidos en numerosos documentos escritos, que pertenecen a distintas civilizaciones, destacándose en todos ellos las referencias relativas a las especies vegetales que eran objeto de uso medicinal. Los papiros hieráticos relativos a la medicina como el de *Edwin Smith, 2980-2970 Antes de Cristo*, el *Rigveda* hindú y las ordenanzas del *Rey Asoka*, en las que reglamentaba tanto el cultivo como la recolección de las especies con interés terapéutico. A todos estos testimonios escritos hay que añadir el compendio chino titulado "*Pen t'sao Kang-mou*", que contiene 8 160 fórmulas, preparadas con 1 871 sustancias, principalmente de origen vegetal. Se conservan igualmente importantes aportes realizadas por las civilizaciones griega y romana, entre las que destaca la efectuada por *Dioscórides* en cuya obra "De Materia Médica", se describen minuciosamente unas 500 especies, así como las enfermedades en que estaba indicado su uso, *Navarro C., 2000.*

Sin embargo, a pesar de la amplísima utilización de las plantas medicinales, o de partes de las mismas con fines curativos, hasta bien entrado el siglo XIX no se contó con los medios y conocimientos necesarios para que su uso estuviera dotado de bases científicas. Desde entonces el estudio de las plantas medicinales ha transcurrido por diferentes etapas; durante la primera mitad del siglo XX se inició el auge de la química y síntesis, seguida de la entrada masiva en el mercado terapéutico de componentes activos procedentes de esta última vía, lo que motivó que muchas de las plantas medicinales empleadas desde la antigüedad, fundamentalmente las destinadas al tratamiento de patologías leves o moderadas, quedaran en el olvido y se llenó el ámbito farmacoterapéutico de forma casi exclusiva, con los medicamentos de origen sintético. Esta situación permaneció así hasta los años sesenta, cuando diversos factores entre los que destacó la necesidad de encontrar nuevas moléculas con actividad farmacológica, conjuntamente con el intento de disponer de medicamentos con menos efectos secundarios que los que presentaban algunos fármacos sintéticos, hicieron volver los ojos de los investigadores a la naturaleza y, en particular, al reino vegetal, *Villar A., 1999.*

Los frutos de estas investigaciones se traducen en que, en el momento actual, el 60% de los medicamentos disponibles en el mercado, en su origen o de hecho, proceden del mundo vegetal. Según estimaciones realizadas por la OMS, alrededor de un 80% de la población mundial recurre en gran medida a los remedios tradicionales. Declaraciones realizadas por esta organización manifestaron que el uso de las plantas medicinales está asumiendo una importancia creciente en la atención primaria de la salud de los individuos y de las comunidades, tanto en los países en vías de desarrollo como en la mayoría de los países desarrollados, existiendo paralelamente un incremento del comercio internacional de estas plantas, *Zhang X., 1998.*

En la actualidad existen una serie de problemas ligados a la comercialización y prescripción de los productos de fitoterapia. En primer lugar se cita el uso de formas farmacéuticas simples y compuestas que contienen como principios activos productos naturales y carecen de estudios previos de formulación para avalar su utilización. Además, se prescribe el uso indiscriminado de plantas sin conocer suficientemente los riesgos de su utilización. Esto en algunos casos ha traído graves consecuencias, referidas en la literatura, entre los que se destacan; *por ejemplo*, las plantas que contienen alcaloides pirrolizidínicos, en las que tras un período de latencia de semanas o meses se detectan distintos síntomas: anorexia, letargo y dolor abdominal, posterior destrucción de hepatocitos y daño en las ramas de la vena hepática, con peligro de trombosis, *Westendorff R. y col., 1992.*

De forma similar, las plantas medicinales con derivados antracénicos (Senes, Frángula, Cáscara Sagrada, etc.), empleadas con demasiada profusión como laxantes, pueden provocar alteraciones en la mucosa intestinal como consecuencia de un uso prolongado, *Dufour P. y Gendre P., 1988.* Otro *ejemplo*, es la posibilidad de enfermar de bocio provocado por especies ricas en glucosinolatos, tales como la coclearia (*Cochlearia officinalis*) y la capuchina (*Tropaeolum majus*), *Bruneton J., 1999.*

De lo expuesto, se deduce que el uso de las plantas medicinales conlleva una serie de riesgos, que en algunos casos pueden resultar, incluso, fatales. El reconocimiento de esta realidad no supone, en absoluto, que se abandone la prescripción fitoterapéutica, pero sí debe conducir al estudio de los remedios tradicionales por métodos científicos, contribuyendo de esta forma al desarrollo de la medicina. Para avanzar hacia una medicina natural más segura y eficaz, es imprescindible fomentar la investigación en esta línea, prestando atención a las plantas más utilizadas y a las menos conocidas. Al igual que en los demás medicamentos, también en los preparados fitoterapéuticos es necesario garantizar la *calidad, seguridad y eficacia*. Las exigencias sobre el control de calidad de las drogas vegetales serán dadas, principalmente por las prescripciones de las farmacopeas y demás regulaciones, *Cañigüeral S., 1998.*

Por otra parte, la clínica y la experimentación farmacológica han demostrado que la acción de una planta no se puede explicar por la de uno de sus principios activos; es entonces cuando hablamos de fitocomplejos en los cuales están los principios activos, otras moléculas aparentemente inactivas, las sustancias coadyuvantes, etc. El principio activo purificado es una molécula muerta que no puede disfrutar de la sinergia farmacocinética que tiene la droga entera y, a su vez, se deduce que ésta tiene una acción más suave y más activa que el principio activo de mayor efecto por interacción con las moléculas consideradas "inertes", que en realidad ejercen una labor terapéutica de indudable valor, pero de alcance aún desconocido en su sentido más amplio. *Fitoterapia, Vademécum de prescripción, 2003.*

En muchos casos se asume que el extracto de planta, como un todo, es la parte activa, ya que es frecuentemente difícil identificar los componentes individuales responsables de la actividad farmacológica y aún más difícil señalar la sinergia entre varios componentes, *Werterhoff K. y col., 2002.*

Por otra parte, los compuestos concomitantes, presente en los fitofármacos junto a las sustancias activas, llamados coefectores o coadyuvantes, poseen una gran importancia en la formulación de un fitomedicamento porque ellos pueden cambiar propiedades físico-químicas de las sustancias activas, tales como la solubilidad y la velocidad de disolución y, por tanto, influyen en los parámetros biofarmacéuticos, como la absorción y la biodisponibilidad. A su vez, la composición y las propiedades de los preparados de plantas medicinales dependen de una gran cantidad de factores diferentes, tales como, la calidad de la planta, grado de reducción del material vegetal y el secado. Todas estas propiedades poseen una gran importancia para los actuales procesos de formulación del polvo o extracto seco a formas farmacéuticas sólidas, *Eder M. y Mehnert W., 1998.*

1.2. Sólidos pulverulentos (polvos)

Los sólidos pulverulentos tienen una gran importancia en Tecnología Farmacéutica, ya que constituyen la materia prima para la elaboración de numerosas formas farmacéuticas, *Vila Jato JL, 1997.* Teniendo en cuenta que el presente trabajo se propone obtener un ingrediente activo de origen natural en forma de polvo, a continuación se exponen aspectos relacionados con las operaciones más utilizadas en la obtención del mismo, así como las propiedades físico química que permiten caracterizar tanto al polvo como a los productos colaterales obtenidos al realizar los procedimientos tecnológicos seleccionados.

1.2.1. Operaciones tecnológicas con sólidos pulverulentos

Extracción: La extracción es la operación galénica que consiste en separar de la droga los principios activos medicamentosos, distinguiéndose tres tipos, según el método utilizado: extracción mecánica, extracción mediante disolventes y extracción por destilación, *Suñé N., 1993.*

El desgrase de los sólidos pulverulentos de origen natural puede ser realizado a través de la operación de extracción, que permite eliminar las sustancias grasas que pueden encontrarse en las distintas partes de las plantas, preferentemente en las semillas. Existen tres tipos de extracción que se aplican dependiendo de las características del material vegetal: La extracción mecánica (de mayor interés la expresión que consiste en presionar fuertemente la droga empleando prensas de acción más o menos automatizada), la extracción mediante disolventes orgánicos (consiste en usar un disolvente que disuelva el aceite y los componentes disueltos en él) y la extracción por destilación (método apropiado, y generalmente reservado, para obtener los aceites esenciales). Cuando la planta tiene un alto contenido de aceites, como el caso de las semillas de *Cucurbita*, dicho aceite se obtiene, preferentemente, por expresión; y cuando la planta tiene un bajo contenido de aceite, éste se obtiene, generalmente, por extracción mediante disolventes orgánicos. *European Pharmacopoeia (Eur. Ph.), 2005.*

Pulverización: La división de sólidos es una operación galénica que consiste en la reducción de tamaño de una droga (materia prima del fármaco, hojas de una planta, etc.), sustancia medicamentosa o excipiente. Si se parte de un material seco se conoce como pulverización y si es carnoso, pulpación. La pulverización es el proceso que más se aplica en Farmacia, *Suñé S., 1993.*

La pulverización se define como el proceso de reducción, por medios mecánicos, del tamaño de partículas de los sólidos pulverulentos. Normalmente se realiza con el fin de aumentar la superficie específica del mismo, lo que trae aparejado una serie de ventajas tecnológicas en la formulación del producto entre las que se destaca el aumento de la velocidad de disolución y de la biodisponibilidad. Para realizar un eficiente proceso de pulverización deben conocerse previamente las características físicas, químicas y toxicológicas del producto. En el caso de los sólidos vegetales, deberán tenerse en cuenta los siguientes factores físicos: estructura del vegetal (ya que en función de la misma, leñosa, fibrosa, etc., se emplearán unos molinos u otros), contenido acuoso y contenido graso, para evitar en estos últimos la formación de pastas, *Souto C., 1997.*

La pulverización se puede realizar manual, utilizando el mortero, o mecánica con molinos. La literatura reporta cinco tipos de molinos que están caracterizados por el mecanismo de pulverización, que aportan tamaños de partícula variables y la selección de los mismos está relacionada con el tipo de material a pulverizar. En los materiales fibrosos, como las semillas vegetales, debe utilizarse el molino de cuchillas, *Aulton M., 2004.*

Tamización: Es una operación básica galénica que tiene por objeto separar las distintas fracciones de una mezcla pulverulenta. Esta operación se efectúa mediante tamices que actúan como barreras mecánicas al

paso de partículas y posibilita evaluar la distribución del tamaño de partículas. Habitualmente, los tamaños de partículas que componen los sólidos pulverulentos se ajustan a una distribución normal o a una distribución logarítmica-normal, comportamiento que es derivado de los histogramas de frecuencia que generan los datos obtenidos al realizar la tamización, *Vila Jato JL., 1997.*

1.2.2. Caracterización físico-química de los sólidos pulverulentos

La caracterización de los sólidos pulverulentos, en especial en lo que se refiere a sus propiedades reológicas, resulta muy compleja. Ello tiene su origen en que son sistemas discontinuos, formados por partículas individualizadas, es decir su comportamiento no sólo depende de las características intrínsecas del material, como su estructura molecular y su pureza, sino también de un considerable número de propiedades asociadas a las partículas individuales que los componen, *Gómez Amoza JL., 1997.*

A continuación se exponen los procedimientos a los que se acude con mayor frecuencia a la hora de caracterizar un polvo de origen vegetal y se señalan algunas referencias que reflejan las consideraciones anteriores:

Análisis granulométrico: El objetivo básico de este análisis en un producto vegetal se resume como la evaluación de la distribución del tamaño de partículas. Este procedimiento utiliza cualquiera de las técnicas conocidas (Tamización, Sedimentación, Coulter, Difracción láser o microscopía) cuya selección depende del tamaño de partículas y el tamaño de la muestra, *Gómez Amoza JL, 1997.*

Higroscopicidad: Muchos compuestos son sensibles a la presencia de vapor de agua o humedad. Este parámetro mide la capacidad que posee el polvo de ganar o perder agua en el medio en que se encuentra y posee una importancia significativa en la estabilidad del polvo, aportando datos que definen las condiciones de almacenamiento de cualquier producto. Este parámetro se mide por métodos gravimétricos, siguiendo las metodologías referidas en farmacopeas y literatura especializada. *Steele T., 2004,* refiere que las metodologías más utilizadas en la actualidad son la reportada en la *Eur. Ph., 1999* (método estático) y la reportada por Callagan JC y col., 1982; ambas clasificaciones permiten definir el grado de higroscopicidad que posee el compuesto analizado.

Propiedades de flujo: Estas propiedades presentan una gran importancia en la formulación de un medicamento, ya que condicionan un considerable número de operaciones básicas implicadas en la elaboración de numerosas formas farmacéuticas sólidas, entre las cuales se encuentra la pulverización, la tamización, el mezclado y la compresión, *Vila jato JL, 1997.* Además existen varios factores que afectan las propiedades de flujo, entre las cuales se destacan cambios en la forma de las partículas, en el tamaño, en la densidad y en la humedad absorbida etc., *Nagel K, 2003.*

Es posible emplear diferentes métodos para medir las propiedades de flujo, los cuales por separado ofrecen información parcial, por lo que se recomienda realizar un análisis global de los mismos, *Amidon GE., 1999*. Este autor agrupa estos métodos de la siguiente forma:

Mediciones angulares: Incluyen la medición del ángulo de reposo, como la más importante, y mediciones angulares relacionadas (ángulos de espátula, de diferencia y de caída). Estas mediciones pueden ser realizadas de forma automatizada, empleando el equipo Hosokawa, o a través de mediciones manuales.

Determinación del índice de compresibilidad y de la razón de Hausner: Son ecuaciones empíricas que utilizan los valores de densidad real y densidad aparente para ofrecer un valor que Carr R, 1965, relacionó con el flujo de los polvos.

Determinación de fuerza de cizalla: Este grupo de métodos permite evaluar las propiedades de flujo de un material, determinando la resistencia al desplazamiento, como consecuencia de la cohesión, de dos capas sucesivas de partículas de un lecho de sólido pulverulento. Para ello se utilizan las llamadas Células de Cizalla, de las cuales la más usada es la célula de *Jenike*. Los datos obtenidos permiten determinar el factor de flujo, cuyo valor permite clasificar el polvo, *Amidon E., 1999*.

Las publicaciones de los últimos años, que refieren la caracterización de sólidos pulverulentos de origen vegetal, incluyen en su mayoría los procedimientos anteriores (*Palma S. y col., 1999; De Souza K. y col., 2000; Palma S. y col., 2002; Kopelman S. y Augsburger L., 2002; Soares LQ. Y col., 2005*) y omiten los estudios de cristalinidad, de forma de las partículas, de solubilidad, etc.; omisión que se justifica, pues estos métodos no serían indicados por la falta de pureza de estos polvos.

1.2.3. Caracterización físico-química del aceite

Los aceites grasos vegetales son, principalmente, triglicéridos sólidos o líquidos de ácidos grasos. Pueden contener pequeñas cantidades de otros lípidos, tales como ceras, ácidos grasos libres, glicéridos parciales o residuos no saponificables. Los aceites grasos vegetales se obtienen de las semillas, el fruto o el hueso/pepita de diversas plantas por expresión o extracción con disolvente.

Después de realizar un análisis de las monografías de aceites vegetales vírgenes, descritas en las farmacopeas actuales se puede resumir que entre los ensayos más usados para la caracterización de los mismos y que aparecen descritos en estas fuentes: *British Pharmacopoeia (B.P.), 2004* y *Eur. Ph., 2005*, se encuentran las constantes físicas: Índice de refracción y rotación óptica; la absorbancia (midiendo el comportamiento de absorción entre 200 y 300 nm); el índice de acidez (A); el índice de lodo (I_l); el índice de peróxidos (P); el índice de saponificación (I_s)

1.3. Estudios analíticos en plantas medicinales

Es conocido que los métodos analíticos, constituyen herramientas imprescindibles para el desarrollo del control de la calidad, estudios de estabilidad y biofarmacéuticos de los ingredientes activos, y de las diferentes formas farmacéuticas diseñadas a partir de ellos. En el caso particular de los estudios analíticos aplicados a los productos farmacéuticos de origen vegetal, se requiere de técnicas muy específicas y sensibles para su implementación, debido a la alta complejidad de las muestras; que presentan gran variedad en sus composiciones y las bajas concentraciones de los metabolitos presentes.

Si se observan las monografías analíticas, de plantas medicinales y preparados fitofarmacéuticos, descritas en las farmacopeas actualizadas (*B.P. y Eur. Ph.*), se puede constatar que aunque la estructura metodológica de la monografía es similar a la de los productos sintéticos, los procedimientos analíticos se conciben de manera diferente. En la *Tabla 1.1* se ejemplifican algunas de las particularidades de estos procedimientos, donde las técnicas analíticas de cuantificación están referidas a la determinación del porcentaje total de un tipo de analito, expresado en base a uno de los metabolitos conocido presente en la planta. Lo anterior está en total correspondencia con la Norma de Control de Calidad establecida por la *European Medicines Agency (EMA)* que plantea que en el caso de los ingredientes activos de plantas medicinales y sus preparaciones, la cuantificación será dada como un rango correspondiente a una cantidad definida de constituyentes con actividad terapéutica conocida, *EMA, 2005*.

Tabla 1.1. Principales particularidades de los ensayos, de ingredientes activos de plantas medicinales, según las monografías analíticas, *Farmacopea Británica, 2004*.

Planta o preparado	Grupo de metabolito	Técnica analítica cuantitativa	Sustancia de referencia en CCD
<i>Ajo (polvo)</i>	aminoácidos (aliina y alicina)	<i>HPLC</i> (contenido de alicina)	Alanina
<i>Hypericum</i> (extracto seco)	hipericinas como hipericina	Espectrofotometría UV-VIS (590 nm)	rutina, hiperósido
<i>Barbado y Cape Aloe</i> (hojas y extracto seco)	derivados hidroxiantracénicos expresado como Barbaloína	Espectrofotometría UV-VIS (512 nm)	Barbaloína
<i>Belladonna</i> (hojas y polvo)	alcaloides expresado como hyosciamina	Volumetría (Neutralización)	Hiosciamina
<i>Birch</i> (hojas), <i>Caléndula</i> (Flores) <i>Eder</i> (Flores)	flavonoides como hyperósido	Espectrofotometría UV-VIS (425 nm)	ácido cafeínico, clorogénico, Rutina
<i>Mucus</i> (Polvo)	lodo	Volumetría Redox	-

La cromatografía en Capa Delgada (CCD) también poseen sus particularidades cuando se utiliza en el control de la calidad de los productos vegetales, ya que en la misma se valora como resultado todas las evidencias que se revelan en la placa cromatográfica (representa la huella digital del producto) y son seleccionadas como sustancias de referencia uno o varios metabolitos, de los cuales se conoce su existencia en la planta pero además está asegurada su comercialización; este último aspecto provoca la coincidencia o no con los metabolitos de interés. Como ejemplo se pueden citar las sustancias de referencia utilizadas en la CCD de algunos ingredientes activos de plantas que aparecen en la B.P., 2004 (Tabla 1.1).

Atendiendo a lo anteriormente señalado *Vlietinck A., 1999*, describió los aspectos más generales que deben ser incluidos en cada uno de los ensayos de las monografías de los ingredientes activos de origen vegetal:

- ✓ Nomenclatura: Usualmente se refiere el nombre botánico de la planta, el género, y la especie, seguido de datos particulares en cada tipo de ingrediente.
- ✓ Definición: Se describe la parte usada de la planta y la forma en que se presenta, así como, el contenido de ingredientes activos expresado como límites de aceptabilidad.
- ✓ Características: Se describen las diferentes características y criterios que pudieran ser aplicados con propósitos de identificación; características organolépticas, características botánicas microscópicas y macroscópicas, así como, algún criterio existente en cuanto a solubilidad, miscibilidad y estado físico.
- ✓ Identificación: En el caso particular de las drogas vegetales y los bálsamos, resinas y gomas, incluye las características botánicas macroscópicas y microscópicas, seguidas de análisis por CCD y de reacciones químicas de identificación, mientras que los aceites volátiles y las tinturas y extractos sólo incluyen estas últimas y los almidones poseen varios ensayos específicos.
- ✓ Ensayos Específicos: De forma general en la mayoría de los ingredientes activos (polvos o extractos) de origen vegetal se describen como ensayos específicos generales la pérdida por desecación, las cenizas totales y las cenizas insolubles en ácido clorhídrico.
- ✓ Ensayo cuantitativo: Constituye una parte esencial de toda monografía y cada método propuesto debe ser validado previamente. Como se observa en la Tabla 1.1 los métodos analíticos que más se refieren en las farmacopeas, con este objetivo, suelen ser la volumetría y la espectrofotometría quedando las técnicas cromatográficas para un número más reducido de monografías.
- ✓ Almacenamiento: No tiene requerimientos oficiales y sólo es necesario garantizar, durante el almacenamiento, la calidad de la droga incluida en la farmacopea. Los principales aspectos que se tienen en cuenta son: la protección de la luz y la garantía de un buen sellado de los recipientes.

Los estudios analíticos en plantas medicinales aparecen muy bien representados en la literatura especializada, fundamentalmente, dirigidos a la evaluación y validación de técnicas que pueden ser utilizadas para el control de la calidad, estudios tecnológicos y biofarmacéuticos. Las técnicas analíticas cromatográficas son las más referidas debido a su principal ventaja, permiten separar las sustancias o aislarlas de un medio más o menos complejo y han sido utilizadas tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo, *Skoog D. y col., 2000*. La gran variedad estructural de los metabolitos presentes en las plantas medicinales explica el amplio espectro que describe la literatura de condiciones cromatográficas estudiadas en este campo.

A la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) le corresponde el mayor porcentaje de publicaciones, siendo las condiciones propias de la cromatografía en fase reversa las más representada. El lugar cimero lo alcanzan los investigadores chinos, los cuales refieren, fundamentalmente, la validación de esta técnica para la determinación de diferentes metabolitos presentes en preparados fitofarmacéuticos; *ejemplos: Liu Cl. Y col., 2004 y Shi JL. Y col., 2005* realizaron estudios encaminados a mejorar la resolución de los cromatogramas HPLC con detección ultravioleta, obtenida en la determinación cuantitativa de constituyentes hidrofílicos de la *Valeriana* y psoralen en la raíz de *Picus hidra*, respectivamente, mientras que *Hu B. y col., 2002 y He J. y col., 2004*, validaron esta técnica para determinar quercetina en *Pinellia pedatisecta* y derivados de stilbeno en *Shengfa*.

Como muestra del uso universal de la HPLC, se presentan trabajos realizados por *Abourashed E. y Khan I, 2000*, en los cuales se valida dicha técnica para determinar la lactona sesquiterpénica Partenolido, presente en el *Tanacetum parthenium*, así también, en estudios de *Wurglics M. y col., 2001*, que utilizan la HPLC para determinar los contenidos de Hiperforina e Hipericina presentes en los productos de St. John`s Word.

Otras técnicas con uso significativo en este campo es la CCD y su similar optimizado la Cromatografía en Capa Delgada de Alta Resolución (HPTLC, del inglés *High Performance Thin Layer Chromatography*). La CCD es utilizada para la determinación cualitativa de los metabolitos activos presentes en plantas y fitomedicamentos, constituyendo un método oficial, presente en la mayoría de las monografías de productos naturales y, además, referida en múltiples trabajos donde se establecieron condiciones cromatográficas y se determinó la huella digital de productos vegetales, *Lan YY., 2003, Agrawal H. y col., 2004, Srisvastava A. y col., 2004*.

Las técnicas espectrofotométricas y volumétricas en el análisis cuantitativo de metabolitos en plantas medicinales y fitofármacos, tiene su uso restringido al control de la calidad de estos, que aparece reflejado en

las farmacopeas. Es de destacar que, dentro de los grupos de metabolitos que posibilitan el uso de estas técnicas están los alcaloides y los aminoácidos.

1.3.1. Técnicas analíticas más utilizadas en la determinación de aminoácidos en plantas medicinales.

Teniendo en cuenta, que las semillas de *Cucurbita moschata* Duch constituyen el objeto de estudio del presente trabajo y que en ese material vegetal los aminoácidos son los responsables de la acción antihelmíntica, *Duvían G., 1953; Esteban H., 1954*, a continuación se expone un resumen de los aspectos más importantes referidos en la literatura sobre la determinación de estos metabolitos presentes en plantas medicinales, los cuales se consideraron para el desarrollo de las técnicas analíticas validadas en esta investigación.

La técnica de CCD resulta una de las más antiguas para el análisis de aminoácidos. Sin embargo, no por ello ha perdido su vigencia, al contrario. Su sencillez, rapidez, y selectividad, así como otras grandes ventajas que posee, tales como, la posibilidad de analizar múltiples muestras simultáneamente, el poco tiempo requerido para su ejecución y la sensibilidad avalan su utilización en la determinación cualitativa de estos compuestos en plantas medicinales. *Por ejemplo*, en el trabajo realizado por *Teodox H. y col., 1998*, utilizaron esta técnica en la separación e identificación de aminoácidos de extractos de las plantas *Bilboa, Gingko y Helix*, utilizando la reacción de ninhidrina como revelador.

Por su parte, la HPLC constituye el método más utilizado hasta el momento en la determinación de aminoácidos en plantas medicinales. Sin embargo, la débil absorción de estos compuestos obliga a realizar previos procesos de derivatización, lo que dificulta el análisis y encarece el método. Según referencias bibliográficas recientes, los agentes derivantizantes más utilizados han sido: el fenilisotiosanato (PICT), presente en múltiples trabajos, destacándose los realizados por *Calull R. y col., 1990; Senden H. y col., 1992 y González JM y col., 1997*, quienes aplicaron esta técnica para la determinación de aminoácidos en granos, en tomates y en vinos rojos, y el O-ftaldehído (OPA) para la determinación de aminoácidos en manzanas, con resultados muy satisfactorios, *Blanco Gómez A. y col., 1990*. Es importante destacar que de forma general estos métodos consumen mucho tiempo (20 a 40 minutos por muestra) y requieren equipamiento especializado para el desarrollo de la reacción por la alta toxicidad de la misma..

La técnica espectrofotométrica indirecta, empleando la reacción de ninhidrina, fue propuesta por *Moore S. y Stein H., 1954*, para el análisis cuantitativo de aminoácidos, y mantiene su vigencia, aunque con pequeñas modificaciones referidas por: *Fukuda S. y col., 1996; Macchi F. y col., 2000; Rahman N. y Kashif M., 2003; Taha EA y Youssef N., 2003*, por sólo citar algunos *ejemplos*. Por su parte, *Jones D. y col., 2002*, compararon esta técnica con la determinación fluorimétrica de aminoácidos libres en muestras de tierra,

utilizando o-ftaldehído y β -mercaptoetanol como reactivo fluorescente, obteniendo resultados satisfactorios en ambas, aunque se demuestra la mayor sensibilidad de esta última. No aparecen reportes en la literatura de la aplicación de esta técnica en la determinación de aminoácidos en la *Cucurbita* spp.

La reacción de ninhidrina, con grupos amino primarios, ha sido ampliamente utilizada en la determinación manual, automatizada y como reactivo *spray* en la CCD para la caracterización de aminoácidos en múltiples campos, siendo considerada por algunos investigadores, como la reacción orgánica más estudiada desde que fue descubierta por Siegfried Ruhemann en 1910. Desde entonces cientos de trabajos científicos aparecen publicados abordando la química y el mecanismo de la reacción, la estequiometría y estabilidad de la coloración, la absorción del compuesto formado y la variación de la coloración para diferentes aminoácidos. *Friedman M., 2004*, publica un amplio trabajo que resume los principales aspectos de esta reacción. Según su valoración el mecanismo de la reacción de ninhidrina produce, con la mayoría de los aminoácidos, un cromóforo coloreado llamado complejo *Ruhemann's purple (RP)* con un máximo de absorción a una longitud de onda de 570 nm, cuyo mecanismo incluye la oxidación del grupo amino, liberándose amonio, el cual se condensa con la ninhidrina reducida y con otra molécula de ninhidrina para producir un aducto púrpura.

Este mismo autor confirma, además, que hay muchos compuestos que producen color con la ninhidrina sin producir RP, tal es el caso de los que aminoácidos pirrolidínicos o iminoácidos (prolina, hidroxiprolina y ácido pipercolico), los aminoácidos polifuncionales (arginina, asparagina, y la cisteína) y otros aminoácidos específicos como la lisina y el triptófano; de forma general todos ofrecen tonalidades que van del amarillo al pardo. Estas reacciones son llamadas reacciones no clásicas de la ninhidrina y en su totalidad han sido estudiadas precisando las estructuras de los derivados formados, a continuación se citan los de mayor interés para este trabajo: Arginina (*Takahashi K., 1976*), Asparagina (*Sheng S. y Kraft J, 1993, Hurst P. y col., 1995*), Cisteína (*Prota G. y Ponsiglione, 1973*), Lisina (*Hsieh C., 1995*), Acido pipercolico (*Moulin M. y col., 2002*), Prolina (*Magne C. y Larher F., 1992*), Triptófano (*Shonberg A. y Singer E, 1978 y Kabir D. y col., 1999*), anión radical de ninhidrina (*Yuferov VR. Y col., 1970 y Schertz T. y col., 2001*).

En este análisis bibliográfico se evidencia el amplio uso que ha tenido la reacción de ninhidrina para la determinación de aminoácidos en diversas matrices, desde que fue propuesta por *Moore S, Stein HA, 1954*, esto se debe, fundamentalmente, a la elevada sensibilidad, el bajo costo, la simplicidad y la rapidez de los análisis. Múltiples *ejemplos* lo confirman; las farmacopeas vigentes citan dicha reacción sugiriendo su uso como revelador útil para la detección cualitativa de aminoácidos por CCD y como reacción colorimétrica en los ensayos de identificación de dichos compuestos formando parte de materias primas farmacéuticas y

medicamentos. También se refiere una amplia utilización en la determinación de aminoácidos en plantas con diferentes fines, tales como agente derivatizante en la HPLC, *Macchi F. y col., 2000; Jones D. y col., 2002 y Moulin M. col., 2002*, como revelador en la CCD, *Laskar S. y col., 2001*. En la planta objeto de estudio en el presente trabajo, *la Cucurbita moschata* Duch, esta reacción ha sido reportada solamente como revelador en la CCD, *Duez y col., 1988*.

1.4. Estudios de preformulación desarrollados en plantas medicinales

De forma general, para la elaboración de preparados fitoterapéuticos se pueden emplear como ingredientes activos: Las drogas vegetales (troceadas o pulverizadas), los extractos (productos obtenidos por extracción) y los principios activos purificados.

Estos productos deberán ser convenientemente preparados, dándoles la forma farmacéutica más adecuada para su administración al paciente. En la *Tabla 1.2* se resumen las formas farmacéuticas más apropiadas de la fitoterapia y algunas particularidades que deben tenerse en cuenta en la elaboración de preparados a base de droga vegetal y de extractos. En el caso de los principios activos purificados, su manipulación no difiere significativamente de los productos de síntesis, *Cañigueral S. y Vila R, 1996*.

Tabla 1.2. Clasificación de los preparados fitofarmacéuticos, *Cañigueral S, 2000*.

A BASE DE DROGA VEGETAL	A BASE DE EXTRACTOS
1. Preparados líquidos a partir de droga cortada: Tisanas (infusión, decocción y maceración)	1. Preparados de extractos secos para administración oral: Tisanas solubles, cápsulas y comprimidos.
2. Preparados a base de droga pulverizada: a) Preparados con polvo de droga desecada (con tamaños de partícula pequeño, 125-300µm): cápsulas, comprimidos y grageas. b) Preparados con polvo de droga fresca: suspensiones del polvo criopulverizado en una mezcla hidroalcohólica.	2. Preparados de extractos líquidos para administración oral o tópica: Gotas, jarabes, elixires, melitos, etc. 3. Formas semisólidas de aplicación externa: Ungüentos, cremas, geles, etc.

Entre los distintos productos derivados de las plantas medicinales, la droga pulverizada y los extractos secos, por razones de manejabilidad, facilidad de estandarización y estabilidad son los que cuentan con mejores perspectivas para ser incorporados en las formas de dosificación sólidas, de más amplia utilización en la actualidad, *Díaz L., 1995*.

Cualquier ingrediente activo que se pretenda comercializar para su uso en la terapéutica debe pasar por una serie de etapas encaminadas a la obtención de un producto seguro y eficaz. El trabajo que abarca el conocimiento de las características básicas, tanto biofarmacéuticas como físico-químicas que van a influir en

la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento, se conoce como **preformulación**, *Vila Jato JL., 1997.*

Por su parte, *Akers M, 1976* plantea que: “Las pruebas de preformulación incluyen todos los estudios realizados en un nuevo fármaco para obtener información útil de la formulación posterior de una forma farmacéutica estable y adecuada biofarmacéuticamente”, definición que mantiene plena vigencia según *Steele T., 2004.*

Si se compara la elaboración de formas farmacéuticas sólidas, a partir de productos naturales, con las que contienen ingredientes activos sintéticos, resulta que en el primer caso, el grado de complejidad es mucho mayor; lo que se explica por las dificultades tecnológicas que se presentan en las diferentes etapas de formulación y que son atribuidas, fundamentalmente, a los requerimientos de dosis elevadas, a la alta higroscopicidad que presentan y las deficientes propiedades de flujo. Teniendo en cuenta esto, la etapa de preformulación de un ingrediente activo vegetal debe incluir, además de la caracterización químico-física del mismo, estudios dirigidos a proponer posibles soluciones a los problemas citados.

En la bibliografía consultada se exponen algunos *ejemplos* de estudios de preformulación, realizados con ingredientes activos de origen natural (polvos y extractos secos), que ilustran la complejidad tecnológica de los mismos y el desarrollo de técnicas o soluciones tecnológicas para contrarrestarla.

Güenechea J., Vademécum, 2003, plantea que: “La actividad farmacológica de los preparados vegetales, es claramente inferior al de muchas moléculas activas en estado puro; lo que determina que con mucha frecuencia resulte necesaria la incorporación de dosis elevadas de estos extractos para alcanzar el efecto farmacológico deseado”. Esto aparece reflejado en la Tabla 1.3, para un grupo de plantas medicinales, que se corresponden con las más usadas con fines terapéuticos.

Tabla 1.3. Dosis de extractos secos de plantas, recomendadas en *Martindale, 1999.*

Extracto Seco	Dosis (mg/día)
<i>Chaphaelis acuminata</i>	1000 – 2000
<i>Papaver Somniferum</i>	300 – 1200
<i>Rauwolfia Serpentina</i>	200 – 400
<i>Ginkgo biloba</i>	300 – 1800
<i>Allium Sativum</i>	50 – 200
<i>Cynara Scolymus</i>	1000 – 2000
<i>Angélica Archangelica</i>	500 – 1000
<i>Peumus Soldus</i>	500 – 2000
<i>Equisetum Arvense</i>	1000 – 3000
<i>Orataegus Oxyacantha</i>	500 – 1000
<i>Fucus Versiculosos</i>	300 – 2000

En concordancia con los datos de la *Tabla 1.3 (Anexo C)*, y teniendo en cuenta que la terapia rechaza la multiplicidad de los intervalos y de la cantidad de medicamento a aplicar, prefiriendo la aplicación de una dosis tras grandes intervalos, *Díaz L. y col., 1996*, afirmaron que en el diseño de una formulación sólida, con productos de origen natural, el ingrediente activo será, sino el componente mayoritario, uno de los de mayor proporción. Estos autores, utilizaron la granulación húmeda del extracto seco de *Plantago Lanceolata*, utilizado como modelo, mezclado con el eudragit E en dos proporciones (5 y 10%), demostrando la efectividad de este polimetacrilato como agente aglutinante para incorporar altas dosis del extracto. Resulta significativo, además, que el proceso intermedio de granulación disminuye la higroscopicidad y consecuentemente mejora las propiedades de flujo de este extracto.

Otro estudio tecnológico, con la incorporación de altas dosis de extracto seco, se realizó por *De Souza TP y col., 2001*, utilizando el extracto de *Maytenus ilicifolia* como modelo. Se evaluó la influencia de excipientes como agentes de desintegración (croscarmellosa sódica y glicolato almidón sódico), lubricantes (dióxido de silicio coloidal y estearato de magnesio) y como sustancia de relleno la celulosa microcristalina y la lactosa, mientras que los perfiles de disolución y parámetros relacionados constituyeron los criterios para evaluar el diseño factorial realizado al efecto. Los resultados avalan el uso de la celulosa microcristalina y la lactosa en la formulación, incorporando altas dosis de ingrediente activo, lo que fue reafirmado por *Isimi C. y Nasipuri K., 2003*, al mostrar su utilidad en la obtención de una forma farmacéutica sólida del extracto de *Anogeissus leicarpus*, con previo proceso de granulación húmeda.

Recientemente, *Soares L.A. y col., 2005*, reafirman la necesidad de desarrollar formas sólidas, con ingredientes activos de origen natural, conteniendo altas dosis y propusieron un proceso previo de granulación seca que permitiría mejorar la compresibilidad, el flujo y la higroscopicidad de los extractos secos usados como modelo. Este trabajo se precedió de un estudio de optimización de tabletas obtenidas por compresión directa de los extractos secos granulados el cual avala, como excipientes, el uso de la carboximetilcelulosa sódica (5%) y el dióxido de sílice coloidal (1,2%) ya que posibilitaron obtener una formulación, conteniendo altas dosis de ingrediente activo, con características adecuadas de dureza, friabilidad y tiempo de desintegración.

Varios autores: *Díaz L. y col., 1996; Palma S. y col., 1999; De Souza K. y col., 2000*, toman en consideración la higroscopicidad como uno de los problemas a solucionar en los ingredientes activos de origen natural, para su uso en formas farmacéuticas sólidas, ya que este parámetro influye negativamente en las propiedades reológicas de estos productos.

Los problemas derivados de la higroscopicidad se analizan en varios estudios; en primer lugar se pueden citar las investigaciones llevadas a cabo por *Plaizier-Vercamem J.A. Y Browier C., 1986*, donde se evaluaron de forma comparativa las alteraciones que experimentan unos comprimidos placebos y otros de características similares, conteniendo extracto seco de *Taraxacum*, estos autores sugieren el uso del eudragit en la formulación como una posible vía para disminuir la fuerte higroscopicidad del extracto.

De Souza K. y col., 2000, evaluó el aerosil 200 y la gelita sol-p, en diferentes proporciones, como adyuvantes en la obtención de polvos a partir de la *Pasiflora edulis var. Flavicarpa*. Todos los polvos se obtuvieron con 40 partes de adyuvante y 60 partes de extracto seco. Se usaron como criterios tecnológicos de comparación la distribución de tamaño de partícula, la higroscopicidad, la humedad relativa. Los resultados muestran que de las proporciones de adyuvantes ensayadas el uso del Aerosil 200 solo exhibe las mejores propiedades tecnológicas.

Otro *ejemplo* significativo es el estudio de preformulación realizado con los extractos secos de *Hipericum perforatum*, que ha demostrado la alta higroscopicidad y su fotosensibilidad, *Billa A. y col., 2001*. En estudios posteriores *Von Eggelkraut-Gottanka SG. Y col., 2002*, buscó la alternativa tecnológica más viable, para resolver los problemas tecnológicos encontrados proponiendo la granulación previa a la compresión utilizando como relleno la celulosa microcristalina o el almidón pregelatinizado y como lubricante el estearato de magnesio. Estos excipientes se seleccionaron después de haber estudiado su compatibilidad con el extracto vegetal teniendo como criterio los perfiles fitoquímicos de los metabolitos activos, *Susan H. y Augstburger L., 2002*.

Por otra parte, en la mayoría de los pocos estudios disponibles sobre formulación de plantas medicinales, se aborda el tema de las deficientes propiedades reológicas que caracterizan los polvos y extractos secos de origen natural y la búsqueda de soluciones para mejorar las mismas, por la importancia que revisten en la obtención de una forma farmacéutica sólida.

El uso de la sílica ahumada (Cab-O- Sil) como excipiente para la elaboración de tabletas que contengan extractos secos de plantas, como ingrediente activo, se estudió por *Palma S. y col., 1999*. Como resultado se obtuvo un producto con satisfactorias propiedades de flujo y compresibilidad para ser procesado a través de la compresión directa. En este estudio se utilizaron los extractos de *Melissa officinalis L., Cardus marianus L. y Peumus boldus L.* que, con deficientes propiedades de flujo, sirvieron como modelos de ingredientes activos. Se comparó la fluidez, densidad y compactibilidad al usar el Cab-O-Sil, con excipientes de compresión directa, tales como; lactosa, fosfato di-cálcico y celulosa microcristalina y los resultados fueron

similares en todos los casos, lo que avala la posibilidad de usar este excipiente en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas con ingredientes activos de origen natural.

Palma S. y col., 2002, desarrollaron un estudio tecnológico para obtener una forma farmacéutica sólida a partir del extracto seco de *Peumus boldus*, evaluando varias formulaciones que contenían cantidades variables de *Avicel PH 101*, *lactosa* y *estearato de magnesio* como excipiente. La evaluación tecnológica demostró que la mejor formulación se obtuvo con una composición de: 42% de extracto seco, 27% de celulosa microcristalina-lactosa, y 4% de *estearato de magnesio*, ya que esta mostró las mejores propiedades reológicas, dureza y desintegración.

Los estudios de estabilidad representan una parte crucial en los estudios de preformulación de un nuevo medicamento porque la inestabilidad de los productos modifica los tres requisitos esenciales de calidad, eficacia y seguridad, *Kommánaboyin B. y Rhodes C.T., 1999*. La estabilidad, definida como el tiempo durante el cual el fármaco mantiene su integridad en términos de cantidad e identidad química, y sus correspondientes estudios de estabilidad aparecen descritos en las normas *Harmonised Tripartite Guideline (ICH), 1996*.

Para las plantas medicinales, sus preparaciones y formas farmacéuticas la *EMEA, 2005*, estableció las normas de control de calidad incluyendo las pruebas de estabilidad, estableciendo que estas últimas deben dirigirse a determinar la estabilidad de los constituyentes con actividad terapéutica conocida, pero no se debe dejar de prestar atención a otras sustancias presentes en la planta demostrando que estas permanezcan en la misma, por ejemplo a través de la CCD. Estas normas establecen que cuando los constituyentes responsables de la actividad terapéutica son conocidos la variación del mismo no debe exceder un $\pm 5\%$, mientras que si los constituyentes con actividad terapéutica no son conocidos se acepta un límite de $\pm 10\%$ del valor obtenido en el ensayo inicial. También establecen las condiciones para desarrollar el estudio de estabilidad.

Teniendo en cuenta los problemas inherentes a los ingredientes activos de origen natural, citados anteriormente, los estudios de estabilidad alcanzan un valor inestimable durante la preformulación de estos productos. Es importante destacar al respecto que, en trabajos publicados recientemente se coincide en que la aplicación de las normas ICH en el campo de las plantas medicinales obliga, en la mayoría de los casos, a realizar ajustes en las condiciones establecidas, tales como la humedad y la temperatura, tomando en consideración la estructura de los constituyentes presentes en la planta o la preparación. Por *ejemplo Bilia R. y col., 2001* demostraron que el estudio de estabilidad en el extracto de *Hypericum perforatum* exigió valores

de temperatura y humedad por debajo de los establecidos, dicho estudio se realizó determinando el contenido total de metabolitos activos, ante la duda de a cual correspondía la acción farmacológica.

Todo lo anteriormente descrito, acerca de la preformulación para ingredientes activos de origen vegetal, muestra que en la evaluación físico-química de los mismos se le debe prestar especial atención a la higroscopicidad, las propiedades de flujo y a la necesidad de incorporar altas dosis en la formulación.

Teniendo en cuenta que, la planta objeto de estudio del presente trabajo es la *Cucurbita moschata* Duch, específicamente sus semillas, a continuación se expondrán los estudios más importantes realizados en diferentes líneas de trabajo referidos con la misma.

1.5. Las Semillas de Cucurbita spp. Estudios realizados en el campo farmacéutico

1.5.1. Características botánicas y usos de la planta

Las semillas de *Cucurbita* spp. son clasificadas como dicotiledóneas, se componen de una almendra aceitosa, rodeada de una testa protectora. El tamaño es aproximadamente de 10 mm., tienen forma de óvalo y color beige, una cubierta seminal de color amarillo pálido, reticulada, con presencia de pelos. La almendra posee un embrión, recubierto por endospermo y perispermo (almendra con albumen) y su uso en el campo farmacéutico ha sido muy amplio, sobre todo en el tratamiento de enfermedades parasitarias, *Guenkov E., 1969; Royal Horticultural Society, 1998.*

Juan Tomás Roig, 1974, en su libro "Plantas Medicinales y Aromáticas", refiere los siguientes aspectos generales de la planta:

- ☀ Nombre Científico: *Cucurbita moschata* Duch
- ☀ Familia: Cucurbitáceas.
- ☀ Nombre Común usado en Cuba: Calabaza.
- ☀ Otros nombres comunes: Calabaza amarilla, calabaza moscada, calabacín, pumpkin, jironon.
- ☀ Descripción botánica: Herbácea anual, rastrera o ascendente de tallos ligeramente angulosos. Zarcillos simples o ramificados. Hojas pubescentes, dentadas, con tres a cinco lóbulos agudos u obtusos. Con flores axilares, solitarias, corola anaranjada de seis a ocho centímetros. Fruto globoso, a veces cilíndrico, periforme o cónico, amarillento o anaranjado, (coincide con *Robineau L., 1995*).
- ☀ Distribución Geográfica: Regiones tropicales y subtropicales (cultivada y subespontánea), originaria de América tropical, (coincide con *Robineau L., 1995*).
- ☀ Usos populares significativos: Se emplean las semillas trituradas y en forma de horchata o emulsión para hacer expulsar las lombrices intestinales. En horchata se prescribe en la nefritis y en las inflamaciones de la vejiga y la uretra. Posee acción gastroprotectiva.

El *Vademécum de Prescripción de Fitoterapia, 2003*, documento oficial para la comercialización de plantas medicinales en España, describe una ficha con información contrastada que incluye los siguientes aspectos:

- ➡ Nombre común: Calabaza
- ➡ Nombres Científicos: *Cucurbita pepo* L., *Cucurbita máxima* Duch.
- ➡ Principios activos: Cucurbitina (0,5-2%), de estructura similar al ácido kaínico; peponósido, peporresina, ácido cucúrbico, leucina, tirosina, vitaminas, ácidos grasos insaturados; oleico, linoleico.
- ➡ Acción farmacológica: Antihelmíntico nematocida (áscaris, oxiuros), diurético, emoliente, ligeramente sedante.
- ➡ Indicaciones: Teniasis ascaridiasis, cistitis, prostatitis, insomnio.
- ➡ Formas galénicas-Posología:
 - ✓ Semillas: 50-100 g /día en adultos, 20-40 g /día en niños.
 - ✓ Semillas (antihelmíntico): 30-40 g de semillas, descascarilladas trituradas.

Por su parte, la *Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos, 1992*, documento oficial para la comercialización de plantas medicinales en Cuba, publicada por el MINSAP, describe los papelillos de calabaza como una de sus formulaciones, y la información publicada sobre los mismos incluye los siguientes aspectos:

- Formulación: Triturar a polvo fino y tamizar las semillas de la calabaza y elaborar papelillos dosificados a 600 mg.
- Almacenamiento: Temperatura ambiente.
- Envase: Papelillos
- Garantía: 30 días.
- Posología: un papelillo en ayunas durante 10 días, descansar 10 días y repetir el tratamiento.
- Acción farmacológica: Vermífugo (uso tradicional)
- Vía de administración: Oral.
- Contraindicaciones: Desconocidas.
- Advertencias: Desconocidas.

Como se observa en Cuba existe una tradición en el uso de las semillas de *Cucurbita*, como antiparasitario. Sin embargo, no se dispone de un ingrediente activo estandarizado, es decir que haya sido evaluado desde el punto de vista analítico y físico químico con vistas a fundamentar una forma farmacéutica adecuada.

1.5.2. Estudios fitoquímicos de las semillas de *Cucurbita* spp

Los estudios fitoquímicos de la *Cucurbita* spp. abarcan desde la década del 60 hasta la actualidad. Se han desarrollado estudios farmacognósticos y químicos que permiten, no sólo determinar sustancias químicas de interés, sino aislar distintos metabolitos entre ellos el responsable de la acción antihelmíntica. Entre los compuestos aislados de las semillas de *Cucurbita* spp., está la Cucurbitina, caracterizada por investigadores chinos, quienes propusieron además su síntesis química (Sun T., 1961).

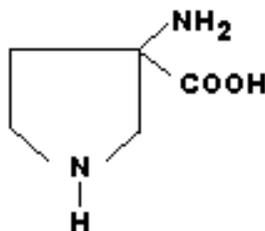


Figura 1.1. Estructura química de la Cucurbitina

Estructuralmente este compuesto es tanto un α -aminoácido, como un β -iminoácido cíclico, *Dunnill M. y Fowden L., 1965*. Este aminoácido, que parece estar limitado al género *Cucurbita*, es el responsable de la actividad antihelmíntica, *Fang S., 1961*.

Hasta el momento el patrón de este compuesto no se comercializa, es por esto que los investigadores que han trabajado el tema siempre incluyen la síntesis de su sal hidrobromada en forma racémica, de acuerdo a los métodos descritos por *Sun T., 1961; Monteiro J., 1973; Marimoto Y., 1987; William R. y Glenn F.J., 1992*, cuyos estudios sirvieron de base para que *Andre P. y col., 1997 y Reminel I. y André P., 1998*, patentaran, junto al aislamiento de su fuente natural, la síntesis de este compuesto. Estos autores coinciden, de forma general, en que el procedimiento, para la obtención de la Cucurbitina, incluye tres etapas: en la *primera* de ellas se obtiene el 3-amino-1-bencil-3-cianopirrolidina; en la *segunda* etapa, este primer compuesto, es transformado en el 1-bencilcucurbitina; el cual *finalmente*, por hidrólisis en medio ácido, aporta la Cucurbitina. La identidad del compuesto sintetizado se comprobó mediante la determinación del punto de descomposición (286 °C) y el espectro RMN-¹³C, además, su reacción con ninhidrina da una coloración amarillo-pardo similar a la prolina e hidroxiprolina, pero diferente al resto de los aminoácidos. Sin embargo, esta síntesis es compleja y conlleva un gran número de pasos.

La cucurbitina se encuentra, mayoritariamente, en la almendra de las semillas de las Cucurbitaceae, especialmente de las especies *Cucurbita pepo L., Cucurbita máxima Duch. y Cucurbita moschata Duch*, *Dunnill P. y Fowden L., 1965 y Reminel I. 1998*, aunque ambas fuentes refieren que se puede encontrar en otras especies de esta familia y también en el fruto pero en muy bajas concentraciones.

María Elisa Jorge Rodríguez

Según publicó la *FAO, 1993; Robineau L., 1995*, la composición fitoquímica de la semilla de *Cucurbita moschata* Duch es: agua, proteínas, aminoácidos, grasas, carbohidratos, calcio, fósforo, hierro, como elementos mayoritarios y se reportan datos de valores energéticos. Tienen hasta un 50% de un aceite graso. La planta entera contiene: ácido cítrico, fumárico, succínico, málico, alcohol, p-hidroxibenzoico, vitamina C y xilitol: 96,5 mg /100 g de planta seca.

Matus Z. y col. 1993, estudiaron los principales caratenoides presentes en la *Cucurbita pepo* empleando la cromatografía de columna con los adsorbentes: óxido de magnesio, celite y carbonato de calcio con hexano. La separación de los segmentos se hizo por HPLC y se reveló la presencia de violaxantina, loteoxantina, aurozantina, luteinepoxido y flavoxantina en pequeñas cantidades. Recientemente se ha retomado el estudio de estos carotenoides, en un estudio realizado en la variedad *Cucurbita moschata*, llegando a identificarse fundamentalmente α , β carotenos, así como derivados de estos, con niveles de 432 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de semilla, lo cual es indicativo de que las semillas son una fuente importante de vitamina A, *González E. y col., 2001*.

Shavenberg P. y Paris F., 1972, estudiaron a la *Cucurbita pepo* y *máxima* aislando del germen de la semilla una sustancia isoprenoide, la Cucurbitacina, cuya acción antiinflamatoria es notable. También es capaz de bloquear la división celular en la estadía de metafase y debería ser probada como anticancerígeno en hipertrofia de próstata. Las cucurbitacinas tienen interés debido a sus propiedades citotóxicas y antitumorales.

Entre el 35 y el 50% del peso de las semillas de *Cucurbita* corresponde a un aceite que ha sido ampliamente estudiado con fines terapéuticos. Este aceite contiene una apreciable cantidad de ácidos grasos insaturados (78%), siendo mayoritarios el palmítico, el esteárico, el oleico y el linoleico. Estudios realizados por *Murkovic M. y col., 1996* señalan que el contenido de vitamina E, especialmente gamma-tocoferoles, es muy alto. Posteriormente *Yoinis Y. y col., 2000* y *El-Adawy T. y Taha K., 2001* refieren que las semillas poseen, además del aceite, un 38% de proteínas, un 37% de carbohidratos y 3 mg /100 g de alfatocoferoles.

De los estudios fitoquímicos reportados se puede resumir, la presencia de aminoácidos, proteínas, carbohidratos y aceite, como componentes mayoritarios; la Cucurbitina y las cucurbitacinas con los ácidos grasos, son los compuestos responsables de las acciones farmacológicas más importantes atribuidas a las semillas: antihelmíntica y antiinflamatoria prostática. Los estudios fitoquímicos de las semillas continúan en nuestros días, recientemente *Koike K. y col., 2005* aislaron y caracterizaron cinco glicósidos fenólicos, a partir de las semillas de *Cucurbita moschata*, llamándole Cucurbitosido A-E.

1.5.3. Propiedades farmacológicas y toxicológicas de la *Cucurbita* spp.

A través de los años se han realizado numerosas investigaciones acerca de la actividad farmacológica y toxicológica de varias especies de *Cucurbita*, desde que Colorado y Mazzotti en 1950, usaron un infuso de semillas de calabazas en pacientes infectados con *Taenia saginata* y *Taenia solium*, obteniendo un 70,6% de efectividad con un solo tratamiento. Duvían G., 1953, estudió el tratamiento del parasitismo intestinal con semillas de calabaza, las cuales según él, tienen propiedades vermícidas y Esteban H., 1954, estudió las características botánicas de *Cucurbita pepo*, así como la morfología e histología de las semillas, su composición química y su farmacología, dando especial atención a su uso antihelmíntico.

Los primeros estudios *in vitro* sobre *Ascoris lumbricoides*, *Fasciola hepática* y *Lumbricus terrestris* se realizó por Mackie A. y Stewart G., 1955, que estudiaron la efectividad de los extractos etéreos, clorofórmicos, en alcohol 95% y en ácido clorhídrico 5%, siendo el extracto más efectivo como antihelmíntico el obtenido de ácido clorhídrico.

Shiao S., 1962 demostró la actividad protectora de la Cucurbitina presente en las semillas de calabaza contra la infección producida en ratones experimentales con *Schistosoma japonicum*; mientras que Bailenger J. y Seguin F., 1966, reportaron que las semillas de *Cucurbita pepo* que creció bajo condiciones controladas contienen la actividad antihelmíntica; se extrajeron dos fracciones, las cuales matan a *hymenolepsis nana* y *dirocvelum dendriticum in vitro e in vivo*, controlan efectivamente a *hymenolepsis nana* en ratones y perros, y a la *Taenia saginata* en el hombre.

Se ha demostrado que los extractos acuosos y alcohólicos de las semillas de *Cucurbita máxima* poseen propiedades antihelmínticas. Se determinó la acción farmacodinámica general de estos extractos sobre diferentes órganos. El extracto acuoso causó una reducción marcada de la amplitud de las contracciones y de la velocidad del corazón de rana, este efecto no se bloqueó por atropina. El tono del músculo intestinal del conejo aumentó con los extractos, proporcionalmente a la dosis. Dichos extractos no surtieron efecto sobre el músculo esquelético y útero de rata, Rivastava A. y col., 1967.

Desde que Fang S., 1961, aisló de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch al aminoácido llamado Cucurbitina y comprobó que inhibía el crecimiento de *Shistosoma japonicum* se le adjudicó a este compuesto la acción antihelmíntica, lo cual se confirmó por investigadores rusos, quienes demostraron dicha acción y realizaron pruebas clínicas en pacientes infestados con Cestodiasis. Estos resultados aparecen reportados por Rybaltovsikii O.V., 1966 y Plomikov A., 1972.

Por otra parte, González E., 1974, realizó un estudio farmacológico de la Cucurbitina, aislada de la *Cucurbita máxima* Duch, en lombriz de tierra y en intestino aislado de conejo, demostrándose un efecto de parálisis del

verme, proporcional a la concentración y al tiempo de contacto, y un efecto contráctil sobre el intestino dependiente de la dosis.

Posteriormente *Fiang S., 1982*, observó que, veinte minutos después de la inyección intravenosa de Cucurbitina, marcada con ^{14}C , a ratones, la radioactividad estaba altamente localizada en el hígado, riñones, ganglios de la raíz dorsal, cartílago traqueal y páncreas. La intensa actividad persistió por 24 horas en estos tejidos, excepto para el páncreas, que mostró una disminución de la concentración con el tiempo. Se observó, también, un nivel moderado de radioactividad en el epitelio nasal, mucosa gastrointestinal, esófago, glándulas salivales, timo, médula ósea y glándulas haeder. Después de tres días, la mayor concentración estaba en los cartílagos. La retención de Cucurbitina en el cartílago puede involucrar su incorporación a la proteína, la localización en el ganglio de la raíz dorsal puede estar relacionada con la alteración de la actividad motora vista después de altas dosis de Cucurbitina.

Queiroz N.A., 1994, realizó una evaluación toxicológica de extractos acuosos de semillas de *Cucurbita máxima* que se administró por vía oral a ratas y cerdos en dosis simples durante cuatro semanas. Los resultados indicaron una ausencia de toxicidad en todos los órganos evaluados.

Investigaciones más recientes comprobaron una vez más, en estudios *efectuados*, la acción antihelmíntica de cuatro plantas del género *cucurbitaceae* entre las cuales estuvo la *Cucurbita máxima* Duch, contra *Hymenolepis nana* y *Aspicularis tetraptera*, se utilizó la piperazina como sustancia de referencia. Los extractos etanólicos de las semillas de esta especie exhibieron una potente actividad contra la *Hymenolepis nana* comparable con el efecto de la piperazina y una actividad menos acentuada contra el otro parásito tratado, *Elisha E., 1997*. Mientras que *Díaz Obregón D. y col., 2004*, realizó estudios preclínicos demostrando, una vez más, la actividad antiparasitaria de estas semillas.

Lo expuesto, anteriormente, muestra que las semillas de *Cucurbita* son reconocidas, en la fitoterapia, por su acción antihelmíntica. Sin embargo, la variedad de metabolitos activos ha posibilitado realizar estudios en diferentes campos: *Amorin CZ. Y col. 1991*, investigaron la actividad antimalárica de plantas de la familia *cucurbitaceas*, *Hase K. y col., 1996*, demostraron la actividad gastroprotectora y hepatoprotector del extracto acuoso de la *Cucurbita moschata*, mientras que en 1997, *Reminel I y Andre P*, investigadores de un instituto francés de cosmetología, patentaron varias preparaciones cosméticas con acción antialérgica, con la Cucurbitina como ingrediente activo. *Evans W. y col., 2000*, señalaron que las almendras fragmentadas de *Cucurbita pepo*, al igual que las de otros miembros de la familia *cucurbitaceae*, están en el arsenal herborístico para el tratamiento de la diabetes.

Por otra parte, el aceite presente en las semillas de *Cucurbita*, ha sido utilizado como antiinflamatorio prostático en la hiperplasia prostática benigna (HPB), lo que propicia la existencia en el mercado europeo de varias formulaciones que lo incluyen como uno de los ingredientes activos. El *Vademécum de prescripción, 2003*, reporta que el aceite de las semillas de calabaza posee un alto contenido en prótidos ricos, a su vez, en aminoácidos esenciales. Sin embargo, su importancia en dietética se debe especialmente a la presencia de un componente, la Cucurbitacina, de interesantes propiedades a nivel prostático. Estudiada de forma aislada, la Cucurbitacina podría intervenir en el bloqueo de la división de las células glandulares (acción antimitótica) ejerciendo, además, un efecto antiinflamatorio. Gracias a esta propiedad, también podría ser utilizado en el tratamiento de la inflamación de la vejiga. Por la importancia farmacéutica y nutricional de este aceite en la última década ha sido objeto de múltiples estudios científicos encaminados, fundamentalmente, a estudiar su composición y a demostrar su acción en la HPB; dentro de estos estudios se destacan los realizados por investigadores alemanes que monitorearon una prueba clínica con más de 2000 pacientes que padecían la enfermedad con resultados muy satisfactorios, *Schiebel-Schlosser G y Friederich M, 1998*. Lo anterior fue también confirmado recientemente por *Gossel W y col., 2006* quienes demostraron la inhibición de la testosterona inducida en la HPB, lo que beneficia significativamente el tratamiento de esta enfermedad.

en la última década dirigidos del aceite

1.5.4. Estudios analíticos aplicados a la Cucurbitina

Numerosos estudios han sido publicados desde la década del 60, por diferentes autores, acerca del contenido aminoacídico y proteico de la familia *cucurbitaceae*. Las semillas han sido examinadas con preferencia a otros órganos vegetativos, ya que su composición suele ser menos afectada por variaciones de factores ambientales, durante el crecimiento de la planta.

En 1965, *Dunill M. y Fowden L.* realizaron un estudio de la distribución de aminoácidos presentes en las semillas de diferentes especies de esta familia, con la CCD bidimensional y la ninhidrina como agente cromogénico; los sistemas de disolventes butanol - ácido acético - agua y fenol - amoníaco permitieron separar e identificar veinticinco aminoácidos en total. Un resultado significativo en este trabajo es haber obtenido en los cromatogramas que la cucurbitina, junto a la asparagina y la alanina, constituían los aminoácidos más abundantes en las especies *Cucurbita moschata* y *Curcubita máxima*.

Bravo R., 1974, realizó un estudio de los aminoácidos presentes en el infuso de semillas de *Cucurbita máxima* Duch, especie chilena. Los mejores resultados se obtuvieron con la cromatografía bidimensional en papel. Se comprobó que el infuso tenía 13 aminoácidos libres, empleando como fases móviles butanol /

ácido acético / agua (80:20:20), fenol al 75% y ninhidrina como revelador, y se determinó que la Cucurbitina estaba en mayor proporción

En 1988, Duez P. y col., realizaron extracciones de Cucurbitina en agua a partir del género *Cucurbita*. Las determinaciones se llevaron a cabo a través de dos métodos analíticos: HPTLC y HPLC. En HPTLC la Cucurbitina apareció como una mancha carmelita, empleando placas de silicagel 60, disolvente metanol / cloroformo / amoníaco 25% y ácido acético (80:10:8,5:1,5 v/v) y como revelador la ninhidrina. Por su parte, la HPLC se usó con una columna Ciano como fase estacionaria y como fase móvil acetonitrilo- buffer pH-2,5 en diferentes proporciones. Las muestras fueron previamente derivatizadas con una mezcla fenilisotiocianato / piridina / agua (1,3:60:40). Como resultado se obtuvo, por ambas técnicas, que el extracto analizado poseía un 0,3% de Cucurbitina, aproximadamente, en las especies *Cucurbita pepo* y *moschata*.

Una determinación estereoselectiva de cucurbitina en semillas de *Cucurbita* spp se realizó a través de cromatografía gaseosa, con detector de ionización de llama, y la cromatografía gaseosa - espectrofotometría de masa, utilizando la columna capilar Chirasil-L-Val como fase estacionaria quiral, mientras que la D, L- Cucurbitina fue previamente transformada en los ésteres derivados de N-trifluoroacético correspondientes a través de la reacción con diferentes alcoholes y el anhídrido trifluoroacético. Se usó como estándar interno el metil pentadecanoato. Este estudio concluyó que el metil éster es el derivado que ofrece mejor resolución y menor tiempo de retención y se recomienda el uso del método descrito por su alta sensibilidad, precisión y selectividad para realizar determinaciones de Cucurbitina en extractos acuosos de semillas de *Cucurbita* spp. Las muestras analizadas eran correspondientes a la especie *Cucurbita pepo* y se determinó que poseía 0,4 %, aproximadamente, de Cucurbitina, *Schenkel F.y col., 1992*.

Es de destacar que para el desarrollo de las tres técnicas cromatográficas descritas anteriormente los autores se vieron obligados a realizar previamente la síntesis del patrón Cucurbitina siguiendo la metodología de *Sun S., 1961*, además, si se comparan los resultados obtenidos se observa gran similitud a pesar de haber usado especies diferentes.

Los estudios fitoquímicos y analíticos encontrados en la literatura son una valiosa fuente de información, los estudios analíticos para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina en las semillas de *Cucurbita* spp. y se tomaron en consideración en el presente trabajo, especialmente las condiciones cromatográficas usadas en la CCD.

1.6. Consideraciones finales del estudio bibliográfico

Las semillas de *Cucurbita* spp. son utilizadas en la terapia mundial por su demostrada acción antihelmíntica y antiinflamatoria prostática. Los aminoácidos, particularmente la Cucurbitina, son los responsables de la

acción antiparasitaria, mientras que a los componentes presentes en el aceite, especialmente las cucurbitacinas, se les adjudica la acción antiinflamatoria. A pesar de la importancia de estas acciones para la terapéutica, en Cuba no existen ingredientes activos estandarizados, obtenidos a partir de la *Cucurbita spp*, que contengan estos metabolitos, y que puedan ser usados en la elaboración de formas farmacéuticas para su dispensación. Para el desarrollo de dichos procedimientos, es apropiado utilizar las operaciones tecnológicas generales para los sólidos pulverulentos, analizadas en este capítulo.

En resumen, con respecto a los estudios analíticos, se precisa que: (A) la metodología analítica para desarrollar el control de la calidad de los productos de origen natural presenta particularidades en cuanto a los procedimientos y concepción, con respecto a los productos sintéticos, referidas en las normas internacionales y farmacopeas, que deben ser tomadas en consideración en los estudios que se desarrollen en esta temática; (B) las técnicas cromatográficas poseen las mayores ventajas para la determinación de metabolitos en plantas medicinales, dada la complejidad de estas muestras y (C) la reacción de ninhidrina ofrece grandes posibilidades para la determinación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos presentes en las plantas.

En lo referente a los estudios de preformulación y la solución de los problemas tecnológicos más frecuentes en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas, a partir de ingredientes activos de origen vegetal, se concluye que: (A) ante la necesidad de incorporación de altas dosis de ingrediente activo, es necesaria la búsqueda de excipientes que, mezclados en pequeñas proporciones, mejoren las propiedades tecnológicas en las formas farmacéuticas sólidas de los fitomedicamentos. Entre los excipientes con mejores resultados, y consecuentemente más utilizados, se refieren: el eudragit, la carboximetilcelulosa, el Cab-O- Sil, y la lactosa. (B) la baja fluidez y la alta higroscopicidad resultan dos problemas tecnológicos presentes en la mayoría de los ingredientes activos de origen natural y que debe ser resuelto para su formulación en formas farmacéuticas sólidas. El proceso previo de granulación seca o húmeda con disolventes no acuosos, y la elaboración de mezclas con excipientes en bajas proporciones constituyen las técnicas más usadas para lograr estos fines. (C) los estudios de estabilidad en las plantas medicinales y sus preparaciones deben ser realizados siguiendo la metodología descrita en las normas de la EMEA, 2005, aunque las características propias del material vegetal imponen que se realicen ajustes de las condiciones sugeridas en dichas normas.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal, equipos y reactivos

Material vegetal

Para la obtención del polvo se utilizaron las semillas secas de *Cucurbita moschata* Duch suministrada por la Empresa provincial de semillas varias, MINAGRI- Villa Clara. Especialistas del Centro Provincial de Sanidad Vegetal comprobaron que dichas semillas respondían adecuadamente al control fitosanitario establecido para garantizar una óptima calidad de las mismas que correspondían a los lotes 5-3623-04-2, 5-3637-05-2 y 5-3650-05-2 de *Cucurbita moschata* Duch.

Equipos:

- Molino de cuchillas, Modelo *Retsh GmbH 5657 Haan West-Alemania*.
- Balanza digital, *Boeco, Alemania*.
- Agitador magnético, *Agimatic-N, Selecta, España*.
- Centrifuga Hettich, *Universal 16 A, Alemania*.
- Rotoevaporador, *Buchi R-200, Francia*.
- Espectrofotómetro UV-VIS, Termo electrón, *Genesys 10UV, Estados Unidos*.
- Microplatina, Modelo *IA- 9100, Selecta, España*.
- Espectrómetro FT-IR, *MATTSON 3000, Inglaterra*.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución, *Agilent 1100 series, EE.UU.*
- Horno Mufla, *SELECTA-HORN, España*.
- Equipo analizador de humedad, *Sartorius MA40, España*.
- Polarímetro. *Polamad, Carl Zeiss, Alemania*.
- Microscopio Estereoscópico, *Carl Zeiss, Alemania*.
- Refractómetro digital de Abbe, *WYA-S, Alemania*.
- Estufa, Modelo *MLW HST - 1512, Alemania*.
- Prensa de tipo tornillo sinfín, *ANCO 202-4, Modelo WMA600, Hungría*.
- Equipo Hosokawa, Summit, EE.UU.
- DSC, Shimatzu, Japón.
- Celula de cizalla de Jenike, *IPT RO-200, Japón*.
- Pignómetro de Helio, *Quantachrome, MPY-Z, Alemania*.

Reactivos:

- Metanol, *Lichrosolv, Merck*
- Ninhidrina, *Merck*.
- Ácido Clorhídrico, *Panreac*
- Acetona, *Merck*.
- Resina Intercambiadora, *Amberlite IR-120, forma H+, BDH. Merck*.
- Hidrato de Cloral, *Riedel de Hagen*.
- Ácido Acético Glacial, *Merck*
- Ácido Sulfúrico, *Panreac*.
- Cloroformo, *Fluka*.
- Amoníaco, *Merck*.
- Ácido Perclórico, *Panreac*.
- Isooctano, *Panreac*.
- Patrones de aminoácidos (Prolina, Hidroxiprolina, Alanina, Lisina), *Scharlau*.
- Asparagina, Leucina, Triptófano, *Sigma*.
- Arginina, Histidina, Glicina y *Rearal*.
- Estearato de magnesio, *Sharlau*.
- Eudragit L100, *Degussa*.
- Avicel pH 101, *Sharlau*.
- Talco, *Sharlau*.
- Tiosulfato de sodio, *Merck*.
- Hidróxido de potasio, *Panreac*.
- Hidróxido de sodio, *Panreac*.

2.2. Métodos de obtención del polvo a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch

Para la obtención del polvo a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch se evaluaron dos métodos (Método I, reportado por la Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos, 1992 y Método II propuesto en este trabajo). Las operaciones y el orden, para ambos métodos, según Figura 2.1:

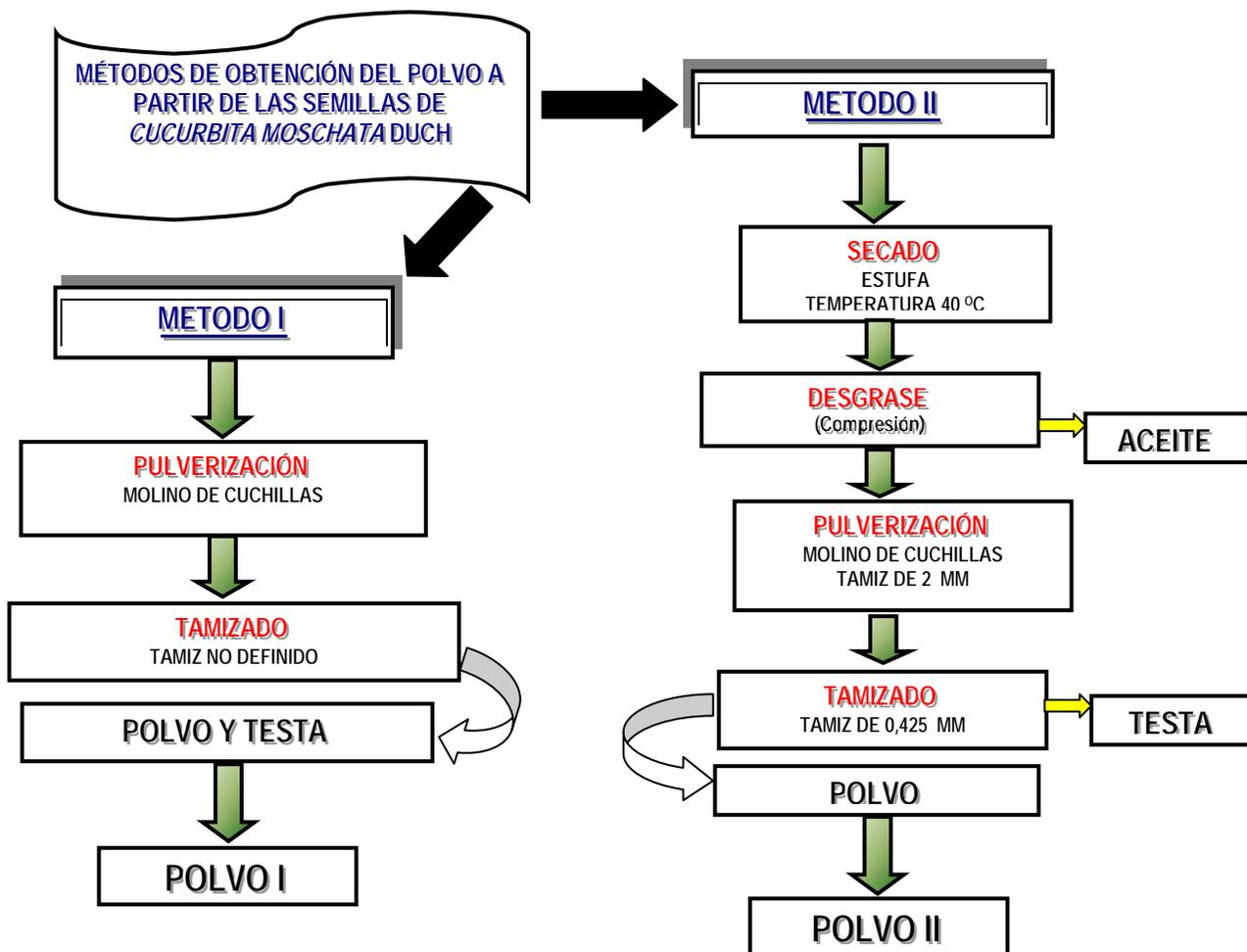


Figura 2.1. Operaciones tecnológicas evaluadas en cada método de obtención del polvo de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch.

A continuación se describen estudios realizados para establecer condiciones en las operaciones incluidas en los métodos:

Decorticado manual: 200 g de semillas se decortican manualmente, separando la testa y la almendra. Se pesaron independientemente y se determinó el porcentaje correspondiente a cada una.

Secado: Las condiciones adecuadas de secado se establecieron, en trabajos precedentes por *Saucedo Y. y Rodríguez D., 1995*, siguiendo las condiciones sugeridas por *Cuellar A., 2000*. Estas incluyeron el método a la sombra, al sol y a la estufa (a 40°C).

Desgrase: Se realizó empleando una prensa de tornillo a alta presión, se determinó el porcentaje de aceite obtenido para lo cual 1 Kg de semilla se introdujo en la prensa, se recogió el aceite, se pesó y se determinó el porcentaje.

Pulverización y Tamización: Se realizó en un molino de cuchillas manteniendo constante la velocidad de rotación de la masa en ambos métodos (2840rpm/min), así como el grosor de la malla (0.1mm) y la alimentación. Teniendo en cuenta la necesidad de lograr el decortinado de la semilla durante el proceso, se procedió a seleccionar el tamiz que propiciara dicha separación, para ello las semillas desgrasadas se molieron empleando el tamiz (adjunto al molino) de mayor abertura (2.0mm), luego se pesó 100g y se procedió a secar en una estufa hasta peso constante, se colocaron en el vibrador de tamices, durante 15 minutos, empleando las siguientes aberturas: 1.00, 0.850, 0.710, 0.600, 0.500, 0.425, 0.355, 0.300, 0.250mm. La selección se realizó por observación visual y a través de un estudio de flotación teniendo en cuenta que en agua la testa se suspende y la almendra (polvo) no. El estudio de flotación se realizó según lo reportado por Brown G., 1959, el sólido correspondiente a cada malla se introdujo en un beaker con 100mL de agua y por decantación, se separó la testa que se secó a 105°C y se pesó.

Para seleccionar en el molino el tamiz idóneo se escogieron las mayores aberturas de malla (1,0 mm, 1,5 mm y 2,0 mm) dadas las características del material y se determinaron los porcentos de sólido obtenido en dos intervalos de tamaños de partículas: (A) menores de 0,425 mm, (B) mayores de 0,425 mm para ambos métodos. La comparación se realizó utilizando la prueba T-Student del paquete estadístico Statgraphics 4.1. Una vez seleccionadas las condiciones en cada operación se comparó el porcentaje de polvo obtenido por cada método teniendo como patrón el porcentaje de almendra presente en la semilla. Para ello se molieron, (tamiz de 2.0mm) semillas decortizadas y sin decortizar empleando ambos métodos, se tamizaron (empleando el tamiz de 0,425mm) y se determinaron los porcentos obtenidos de polvo y testa para cada caso.

Se realizó a través un análisis económico preliminar de cada uno de los métodos. En ambos métodos se considera como base de cálculo 10 kg de materia prima y el valor de la producción se calculó sobre la base de los precios actuales de venta internos con los siguientes datos. Para el cálculo del costo de producción se tuvo en cuenta el precio de la materia prima (1Kg de semilla: \$66) y se determinó el costo de operación como la suma del costo de las operaciones incluidas en el método. Para esto último se tuvo en cuenta el precio de la energía (0,09\$/Kw), el consumo de energía en cada operación (secado \$0,47Kw/h, desgrase 0,8 Kw/h, molienda 0,7 Kw/h y el tamizado 0,06 Kw/h) y el tiempo que demora cada operación (Método I: molienda 20 minutos y tamizado 30 minutos y para el Método II: secado 1h, desgrase 15 minutos, molienda

15 minutos y tamizado 15 minutos). El costo de la mano de obra de obra se valoró como el salario de 2 operadores durante dos días de trabajo (\$60). Además se tuvo en cuenta que el precio de los papelillos en el mercado cubano es \$ 0,10 y se estimaron los siguientes precios para los subproductos obtenidos por ambos métodos: Para la testa 0,27\$/Kg (asumiendo su similitud, por el contenido de proteínas, con el pienso que se comercializa a partir de la soya) y para el aceite, obtenido solo por el método II, 5 \$/Fco,(frasco de 120 mL) . Se calculó, además la ganancia de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ganancia = Valor de la producción – Costo de la producción

La comparación de los polvos I y II se realizó considerando los porcentos de polvo, los subproductos obtenidos y los resultados del análisis económico.

2.3. Estudios analíticos para establecer la monografía de control de calidad del polvo

Los estudios que a continuación se detallan se realizaron utilizando el polvo II, es decir el polvo obtenido por el método II.

2.3.1. Ensayos cualitativos.

- a. Descripción microscópica: Se le realizó a la droga pulverizada, según técnica descrita, *Evans W, 2000*, observando en un microscopio esteroscópico, empleando una solución de hidrato de cloral, para determinar la presencia de elementos que pudieran estar presentes en la célula vegetal, tales como almidón, lignanos, tricomonas epidérmicos, etc. La evaluación descrita por *Guenkov E, 1969 y Royal Horticulural Society, 1998* para las semillas de *Cucurbita moschata* Duch sirvió de referencia en este ensayo.
- b. Reacción de Foling: Se pesaron 50 mg del polvo se adicionó 2mL de agua y 0,5mL de una solución del reactivo de Foling (en agua en la proporción 1:3), se adicionó 2,5 mL de NaOH 0,5 M. Un ensayo positivo estará indicado por la aparición de una coloración azul intensa.
- c. Reacción con ninhidrina: Se pesaron 50 mg del polvo se adicionó 2mL de agua y 0,5mL de solución de ninhidrina (ninhidrina al 0,5%, disuelta en una mezcla acetona: agua: ácido acético (80:18:2) y se calentó en baño de María hasta la aparición de un color azul violáceo.

La determinación del limite de detección (LD) en ambos ensayos se realizó según la metodología descrita por *Burriel F, 2001*.

- d. Cromatografía en Capa Delgada (CCD): Son utilizadas las condiciones cromatográficas descritas por *Duez P. y col. 1988 y Schenkel E. y col., 1992*, para la identificación de la Cucurbitina obtenida por síntesis química.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Fase estacionaria: Placas de gel de sílice GF para cromatografía en capa fina, *Merck* (dimensión 20x20cm)

Fase móvil: Metanol-cloroformo-amoniaco al 25%-ácido acético glacial (80:10:8,5:1,5).

PROCEDIMIENTOS:

Muestra problema: Se disolvió 1g del polvo en 40 mL de agua, se agitó durante 30 minutos a 50°C, se centrifugó durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento, añadiendo en la segunda extracción 20 mL de agua al residuo, se juntaron los sobrenadantes y se añadió 20 mL de metanol, se colocó en refrigeración por 12 horas, se centrifugó de nuevo 30 minutos para eliminar las proteínas, se filtró. Se rotoevaporó el disolvente, se redisolvió en 2 mL de una mezcla metanol: agua (1:1) y filtró.

Muestra referencia: Se disolvió 10 mg de los patrones de aminoácidos en 1 mL de metanol: agua (1:1).

Aplicación: Se aplicó 4 µL para muestra referencia y para la muestra problema.

Desarrollo: Se aplicó por separado en la placa 4 µL de muestra problema y de cada muestra de referencia. Se dejó secar la placa al aire. Se corrió el solvente hasta una distancia de 10 cm.

Secado: Al aire, durante 15 minutos.

Detección: Se asperjó con la disolución de ninhidrina al 2%, disuelta en una mezcla acetona: agua: ácido acético (80:18:2), se calentó a 60 °C durante cinco minutos.

En esta técnica CCD se evaluaron 12 patrones de aminoácidos (glicina, leucina, treonina, prolina, hidroxiprolina, asparagina, L-fenilamina, valina, L-tirosina, triptófano, alanina, L-lisina) y la Cucurbitina aislada. Los patrones se prepararon disolviendo el aminoácido en una mezcla metanol: agua (1:1), con una concentración 1mg/mL.

Cromatografía bidimensional: Se utilizó la misma fase móvil (Metanol-cloroformo-amoniaco al 25%-ácido acético glacial (80:10:8,5:1,5). como segundo solvente. Se aplicó la muestra problema se corrió el solvente una distancia de 10 cm en dirección lineal, se detuvo la corrida, se secó, se introdujo la placa en la cámara y se corrió, el mismo solvente, en una dirección 90° con respecto a la anterior. Se secó la placa y se reveló con la solución de Ninhidrina al 2%.

2.3.2. Ensayos específicos. Determinación de los límites de especificación

En todos los ensayos Se usó el método estadístico de *Bowker* para el cálculo de las especificaciones, *Espinosa M, 1987*. En este caso se procesaron 25 muestras, para determinar el límite unilateral de máximo en cada prueba, se tomó como criterio un 95% de confianza y que el 99,5% de los límites calculados contengan el 99,5% de los elementos.

Pérdida por desecación

PROCEDIMIENTO: De la muestra de ensayo se pesó 1 g, con un error máximo de 0,5 mg, se transfirió a un pesafiltro, previamente tarado y se desecó a 105°C durante dos horas. El pesafiltro se colocó en una desecadora, donde se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante dos horas; se repitió esta operación hasta obtener una masa constante. El ensayo se realizó por triplicado y la pérdida por desecación se calculó por la siguiente ecuación:

$$P_s = \frac{(P_f + M_{sd}) - (P_f + M_d)}{(P_f + M_{sd}) - P_f} \cdot 100$$

Donde:

Ps: Pérdida por desecación, %
P_f: Masa del pesafiltro, g
M_d: Masa de muestra desecada, g
M_{sd}: Masa muestra sin desecar, g

Cenizas totales

PROCEDIMIENTO: De la muestra de ensayo se pesó con exactitud 0,5 g en un crisol previamente tarado, como se describió en la operación anterior. Se calentó la sustancia hasta su total carbonización, y se dejó enfriar. Se humedeció el residuo con 1 mL de ácido sulfúrico y se calentó, en una plancha de calentamiento, hasta que no se observaron humos densos blancos. Se incineró a 800 °C, durante dos horas en una mufla. Se colocaron los crisoles en una desecadora sobre sílicagel y se enfrió hasta temperatura ambiente. Al día siguiente se pesaron nuevamente y se introdujeron nuevamente en la mufla durante 30 minutos, el procedimiento se repitió hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no fue mayor a 0,5 mg. El ensayo se realizó por triplicado y el cálculo de los residuos de ignición se realizó, según la siguiente ecuación:

$$R_i = \frac{(M_f - M_i)}{M_M} \cdot 100$$

Donde:

R_i: Residuos de ignición, %
M_i: Masa inicial del crisol, g.
M_f: Masa final del crisol, g.
M_M: Masa de muestra, g.

Cenizas insolubles en ácido clorhídrico

PROCEDIMIENTO: Las cenizas insolubles en ácido clorhídrico (HCL) se obtuvieron al tratar el residuo de las cenizas totales o sulfatadas con este ácido y se expresaron con respecto a 100 g del producto analizado. En el crisol, se añadió al residuo obtenido en la determinación de cenizas sulfúricas o totales, 15 mL de agua y 10 mL de HCL. Se cubrió con un vidrio de reloj y se hirvió, en una plancha de calentamiento, suavemente durante 10 minutos. Después de enfriarlo se filtró a través de un papel de filtro sin cenizas y se lavó con agua caliente hasta que el filtrado sea neutro. Las cenizas insolubles se desecaron, se calcinaron al rojo oscuro, se

dejaron enfriar en el desecador y se pesaron. Se repitió la calcinación hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no fue superior a 1 mg.

2.3.3. Ensayo cuantitativo. Espectrofotometría UV-VIS, utilizando la reacción de ninhidrina.

2.3.3.1. Definición de las condiciones experimentales para la técnica.

Estos estudios incluyen cuatro evaluaciones:

- ✓ Evaluación de los factores que influyen en la estabilidad del color.

Muestra problema: Se pesó 2 g del polvo, se añadió 20 mL de agua destilada y se agitó durante 30 minutos a 50 °C. Se centrifugó a 6000 r.p.m durante 30 minutos y se separó el sobrenadante. El procedimiento se repitió juntándose los sobrenadantes. Se añadió 40 mL de metanol y se mantuvo en refrigeración durante 12 horas. Se centrifugó a 6000 r.p.m durante 15 minutos y se separó el sobrenadante. Se rotoevaporó a sequedad y el residuo se redisolvió en 2 mL de metanol: agua (1:1).

Reacción colorimétrica de la muestra problema): Se tomaron 25 µL de la muestra problema, disueltas en metanol: agua (1:1), se adicionaron 0,5 mL de la solución de ninhidrina (solución preparada al 0,5% en una mezcla de acetona: agua: ácido acético (80:18:2)), se calentó y se enrasó a 2 mL en volumétrico, con solución metanol: agua (1:1). La influencia de la temperatura se valoró en el rango de temperatura de 30 a 80°C en intervalos de 10°C; el tiempo de calentamiento en intervalos de 10 minutos, desde los 10 hasta los 60 minutos; mientras que el tiempo de lectura se realizó desde el primer minuto de detenida la reacción hasta los 50 minutos posteriores en intervalos de 5 minutos.

- ✓ Establecimiento de las condiciones óptimas para desarrollar la reacción de ninhidrina través de un diseño factorial 2³.

Con vistas a establecer las condiciones óptimas para desarrollar la técnica espectrofotométrica, utilizando la reacción de Ninhidrina, se desarrolló un diseño factorial 2³-con una réplica; las variables independientes fueron: Temperatura (X₁); Tiempo de calentamiento (X₂) y Tiempo de lectura (X₃). Los niveles máximos evaluados fueron: 60°C, 40 minutos y 15 minutos, y los niveles mínimos: 40°C, 10 minutos y 5 minutos, respectivamente.

Tabla 2.1. Matriz del diseño factorial para la definición de condiciones óptimas de la reacción de ninhidrina

Nº Combinaciones	X ₁ (Temperatura) (°C)	X ₂ (Tiempo de Calentamiento) (min.)	X ₃ (Tiempo de Lectura) (min.)
1	60	10	5
2	60	40	5
3	40	10	5
4	40	10	15
5	40	40	15
6	60	40	15
7	40	40	5
8	60	10	15

La Tabla 2.1 muestra la matriz definida para el diseño de experimentos, donde se evaluó la incidencia de dichas variables independientes sobre los valores de absorbancia. Para el análisis y evaluación de los resultados experimentales se utilizó el paquete estadístico *Statgraphics, versión 4.1, 1999*.

- ✓ Selección del patrón analítico para determinar el contenido de aminoácidos totales en el polvo:

Se realizó el espectro de absorción ultravioleta de los aminoácidos, asparagina, lisina, prolina, hidroxiprolina, Cucurbitina, disueltos en metanol: agua (1:1) a una concentración 1mg/mL y derivatizados previamente con ninhidrina utilizando las condiciones seleccionadas previamente en el diseño experimental. Se comparó la $\lambda_{\text{máx.}}$ de la muestra con la $\lambda_{\text{máx.}}$ obtenida para los patrones evaluados.

- ✓ Determinación de la absortividad específica de la asparagina:

Se prepararon soluciones de concentración creciente de asparagina (0,001-0,0008 Mol/L), se desarrolló la reacción colorimétrica de ninhidrina (se adicionó 0,5mL de solución de ninhidrina, se calentó 40 minutos a 60°C) se determinó la absorbancia a 320nm. Con los valores promedios se obtuvo la curva de calibración correspondiente. La absortividad de la asparagina se determinó por la relación de la pendiente de dicha curva y la masa molar de la asparagina.

2.3.3.2. Validación de la técnica colorimétrica

La técnica propuesta se sometió a un proceso de validación, según la metodología de las *Normas ICH, 1996*. Los resultados se expresaron como valores de absorbancia y en su análisis estadístico se utilizó el *Microsoft Office Excel, 2003*, se seleccionó 5% como nivel de significación.

Muestra problema: Se pesó 2 g del polvo, se añadió 20 mL de agua destilada y se agitó durante 30 minutos a 50 °C. Se centrifugó a 6000 r.p.m durante 30 minutos y se separó el sobrenadante. El procedimiento se

repetió juntándose los sobrenadantes. Se añadió 40 mL de metanol y se mantuvo en refrigeración durante 12 horas. Se centrifugó a 6000 r.p.m durante 15 minutos y se separó el sobrenadante. Se rotoevaporó a sequedad y el residuo se redisolvió en 2 mL de metanol: agua (1:1)

Muestra referencia: Se Diluyó 10 mg de asparagina en una mezcla metanol: agua (1:1) hasta completar 10 mL.

Reacción colorimétrica de las muestras: Se tomaron 120 μ L de la muestra de referencia y 25 μ L de la muestra problema, disueltas en metanol: agua (1:1), se adicionaron 0,5 mL de la solución de ninhidrina, se calentó a 60 $^{\circ}$ C por 40 minutos y se enrasó a 2 mL en volumétrico, con solución metanol: agua (1:1).

Procedimiento: Se midió la absorbancia de la muestra por comparación con la disolución de referencia a 320 nm, frente a la solución de ninhidrina como blanco, se realizó la lectura durante los primeros 10 minutos después de detenida la reacción. Se calculó el contenido (en %) de aminoácidos, calculado en base a asparagina, a partir de la siguiente ecuación:

$$C(\%) = \frac{A_M \cdot 1.72}{M_M}$$

Donde

C: Concentración de aminoácidos en el polvo, en base a asparagina, expresado en %.

A_M : Absorbancia de la muestra problema

M_M : Masa de la muestra problema, g.

El procedimiento de Validación se describe en el *epígrafe 2.5*. Una vez validada la técnica se aplicó a la determinación del contenido total de aminoácidos presentes en el polvo, en base a asparagina, siguiendo la metodología descrita en este epígrafe. Se calculó el límite inferior de especificación para este ensayo empleando el método de Bowker, se analizaron 10 muestras y para los cálculos se asumió un 95% de confianza y que el 99,5% de los valores estuvieran por encima del límite inferior de especificación.

2.3.4. Establecimiento de la monografía analítica para el control de la calidad del polvo. Aplicación en la comparación del polvo obtenido en este trabajo y el polvo que actualmente se comercializa en Cuba

Los polvos I y II obtenidos por los Métodos (descritos en el *epígrafe 2.2*) se evaluaron, utilizando la monografía de control de calidad propuesta en el presente trabajo. Se procesaron diez muestras y los resultados obtenidos se compararon a través de la prueba t de Student, utilizando el paquete estadístico Statgraphics 4.1, 1999.

2.4. Definición de las condiciones experimentales para la utilización de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación cuantitativa de la Cucurbitina

2.4.1. Aislamiento y evaluación de la Cucurbitina para su utilización como patrón analítico

Aislamiento

Se pesó 4 g del polvo II, se adicionó 20 mL de agua y se sometió a agitación constante, se calentó a 50 °C, por dos horas. Posteriormente la mezcla se centrifugó, el sobrenadante se colectó y el residuo se le realizó otras dos extracciones, de manera similar. Los sobrenadantes se combinaron y se le adicionó un volumen equivalente de metanol, para propiciar la precipitación de las proteínas, la muestra se mantuvo en el refrigerador durante 24 horas. El metanol presente se eliminó por rotoevaporación y la muestra se pasó a través de una columna de resina intercambiadora de iones, Amberlite IR-120, la cual fue previamente regenerada con el siguiente procedimiento:

- ✚ Por cada 12 g de la resina se pasó 60 mL de HCL 1N, y luego se lavaron con abundante agua hasta pH neutro al papel de tornasol. Después de pasar la muestra por la columna a una velocidad de 1 mL/min, se lavó con abundante agua y se eluyó con 40 mL de hidróxido de amonio al 1% hasta que se obtuvo una respuesta negativa con la reacción de ninhidrina. El eluato se rotoevaporó a sequedad. El residuo siruposo se usó disuelto en una mezcla metanol: agua (1:1), *Renimel I, 1998*.

Cristalización

Como paso previo a la evaluación, se cristalizó la Cucurbitina obtenida, con el objetivo de purificarla, lo que se logró según el siguiente procedimiento: Al residuo siruposo se le añadió 5 mL de la mezcla metanol: agua (1:1), se agitó en baño ultrasónico durante cinco minutos y se le adicionó gotas de ácido perclórico al 60%, hasta que se alcanzó aproximadamente pH-5. Se colocó en el refrigerador durante tres días como mínimo y se obtuvo el precipitado de perclorato de Cucurbitina. El precipitado disuelto en 5 mL de agua es pasado de nuevo por la resina con el consiguiente tratamiento con hidróxido de amonio, *Renimel I., 1998*. El eluato se evaporó a presión reducida y se obtuvo la Cucurbitina.

Evaluación de la Cucurbitina aislada y cristalizada

La evaluación del sólido obtenido incluyó los siguientes ensayos:

- ✚ Cromatografía de Capa Delgada: Se realizó utilizando la metodología, reportada por Schenkel E., 1992. Como fase móvil se empleó una mezcla metanol-cloroformo-amoniaco(25%)-ácido acético (80:10:8,5:1,5) y como fase estacionaria folios de aluminio cubiertos por sílicagel no fluorescente de dimensiones: 10x20 cm y 0,2 mm de espesor. Como revelador se usó una solución de Ninhidrina al 0,5% disuelta en una mezcla de acetona: agua: ácido acético (6:2:2)

- ✚ Determinación el punto de descomposición de la Cucurbitina: Se realizó según metodología de *Duez P. y col., 1988*, con el uso de la Microplatina.
- ✚ Espectrofotometría UV-VIS: Se realizó el espectro UV en una solución metanol: agua (1:1) utilizando un Espectrofotómetro *Genesys 10*, en el rango de 200 a 300nm.
- ✚ Espectrofotometría IR: Se realizó el espectro IR utilizando tabletas de bromuro de potasio (KBr) utilizando un equipo FT-IR. El espectro IR se midió en la región 1000 y 3498 cm⁻¹.

Determinación de la pureza de la Cucurbitina

Método volumétrico: Se utilizó el método volumétrico registrado en la *B.P., 2004*, para la determinación cuantitativa (pureza) de aminoácidos básicos.

Procedimiento: Se disolvieron 150 mg de la sustancia a examinar en 50 mL de agua (3 mg/mL), usando como indicador 2 mL de rojo metilo mezclado (Disolver 0,1 g de rojo de metilo y 50 mg de azul de metileno en 100 ml de etanol). Se valoró con ácido clorhídrico 0,1 M hasta el cambio de color del indicador del verde al rojo violeta. 1 mL de ácido clorhídrico 0,1 M equivale a 13 mg de C₅H₁₀N₂O₂

$$P_{\text{Cucurb}} = \frac{V_{\text{HCL}} \cdot f \cdot 13}{M_{\text{cucurb}}} \cdot 100$$

Donde:

P_{Cucurb}: Pureza de la Cucurbitina, %

V_{HCL}: Volumen de solución de HCl 0,1 mol/L consumido por la muestra, mL.

f: Factor de corrección de HCl 0,1 mol/L.

M_{cucurb}: Masa total de Cucurbitina, mg.

Validación: Para la validación de esta técnica se desarrollaron los parámetros Linealidad y Precisión. Para ello se siguió la metodología de las *Normas ICH, 1996*, que a continuación se describen:

- Linealidad: Se procesaron dos curvas, cada una de las cuales incluyeron muestras problemas de concentración creciente de analito (1, 2, 3, 4 y 5 mg/mL), se le aplicó por igual la técnica volumétrica descrita y el tratamiento matemático de los resultados, que tuvo en cuenta los términos: coeficiente de correlación, coeficiente de variación de los factores respuestas, desviación estándar relativa de la pendiente, un análisis de varianza (ANOVA) y el coeficiente de calidad (CC).
- Precisión: Este parámetro incluyó la repetibilidad y la precisión intermedia; en el primer caso se procesaron cinco muestras, con concentración de 3 mg/mL, por un mismo analista y en un mismo día, mientras que la precisión intermedia consistió en un procedimiento similar realizado por dos analistas y dos días. En ambos casos se determinó el coeficiente de variación de los resultados, mientras que la precisión intermedia se fundamentó estadísticamente a través de una prueba t de Student y del Test de Cochrans.

2.4.2. Puesta a punto de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina en el polvo.

Muestra problema: Se pesó 2 g de polvo de *Cucurbita moschata* Duch, se adicionó 20 mL de agua destilada, se colocó bajo agitación media hora a 50 °C, se centrifugó y se separó el sobrenadante. El procedimiento se repitió dos veces más con 10 mL de agua destilada cada vez, se colectaron los sobrenadantes y se adicionó 40 mL de Metanol, manteniendo la muestra en refrigeración durante 12 horas. Se centrifugó a 6000 r.p.m durante 15 minutos y se separó el sobrenadante que es rotoevaporado para eliminar el metanol. La muestra obtenida se hizo pasar por una columna intercambiadora de 60 cm de largo y 3cm de ancho, rellena con resina Amberlite IR – 120.

La resina se regeneró previamente cuando se hizo pasar HCl 1N por la columna a 1 mL/min., teniendo en cuenta que para 12 g de resina se requieren 100 mL de HCl 1N; luego la columna se lavó con abundante agua destilada hasta pH neutro al papel de tornasol. La muestra se puso en contacto con la resina, a la cual se le realizaron sucesivos lavados con agua. Posteriormente se arrastraron los aminoácidos con una solución de amoníaco al 10 %.

La muestra obtenida se rotoevaporó a sequedad y el residuo resultante se redisolvió en 2 mL de metanol: agua (1:1)

Muestra referencia (a): Se pesó exactamente 5 mg de Cucurbitina y se disolvió en mezcla metanol: agua (1:1), se completó el volumen hasta 10 mL. Se obtuvo una solución de concentración 0,5 mg/mL.

Muestra referencia (b): Se tomó 1 mL de la muestra referencia (a) y se completó el volumen hasta 10 mL. (Concentración 50 ppm).

Tratamiento previo de derivatización con Ninhidrina: Se tomó 500 µL de la muestra problema, y 100 µL de una muestra referencia, se añadió 500 µL de la solución de ninhidrina 0,5%, se calentó durante 40 minutos a 60 °C y se completó a 2 mL con una mezcla metanol: agua (1:1). Se filtró usando filtro 0,45 micras.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Las condiciones cromatográficas evaluadas en este trabajo fueron:

Dimensiones de la Columna: Longitud (l = 150 mm) y diámetro (d = 3,9 mm)

Fase estacionaria: Gel de sílice octadecilsililado (C₁₈) para cromatografía (5 µm) .

Fase móvil: Acetonitrilo, Agua (30: 70 V/V).

Caudal: 1 mL/min.

Detección: Espectrofotométrica a 320 nm.

Inyección: 20 µL

Tiempo de recorrido: 15 minutos.

2.5. Procedimientos para la validación de las técnicas espectrofotométrica UV-VIS y de HPLC

se evaluaron algunos parámetros de desempeño para ambos métodos, según la literatura consultada (*Thompson M, 1995; ICH, 1996; Eurachem, 1998; Thompson M. y col., 1999*). El procesamiento de los resultados se realizó utilizando las posibilidades de cálculo estadístico del *Microsoft Office Excel, 2003*.

Linealidad

PROCEDIMIENTO: Se construyeron tres curvas de calibración en el rango de concentraciones siguiente:

Espectrofotometría UV-VIS: Las concentraciones del patrón para construir la curva de calibración fueron: 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm y 100ppm. Para esto se pesó 10 mg de asparagina y se transfirió a un matraz aforado de 10 mL; se disolvió y se completó a volumen con metanol: agua (1:1). A partir de esta solución se realizaron diluciones en 2 mL que permitieron obtener las concentraciones señaladas.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución: Las concentraciones del patrón Cucurbitina fueron: 30ppm, 40ppm, 50ppm, 60ppm y 70ppm. Para ello se pesó 5 mg de Cucurbitina, se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, disolviendo y completando volumen con metanol: agua (1:1) (muestra referencia (a)). Se tomó 1 mL de la muestra referencia (a) se transfirió a un volumétrico de 10 mL y se completó el volumen con el mismo disolvente. A partir de esta solución se realizaron diluciones en 2 mL que permitieron obtener las concentraciones señaladas.

Criterios adoptados: r : Coeficiente de correlación múltiple (Criterio ≥ 0.9900); C.V.F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas (Criterio $< 5\%$); Sbrl %: Desviación estándar relativa de la pendiente (Criterio $< 2\%$); Error típico (Et) Desviación Standard de Y (Sy) Criterio $Et < Sy$; $a \pm tSa$ y $b \pm tSb$ Límites de confianza del intercepto y de la pendiente respectivamente (Criterio: Para \underline{a} Contener el cero y para \underline{b} no contenerlo). También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se determinó el coeficiente de calidad (CC) (Criterio $CC < 2,5\%$)

Precisión

PROCEDIMIENTO: Este parámetro incluyó la repetibilidad y la precisión intermedia. En el primer caso se procesaron seis muestras (concentración 100%) a las cuales se les aplicó la técnica a validar en condiciones homogéneas, un mismo analista y en un mismo día; mientras que la precisión intermedia consistió en un procedimiento similar, con la misma concentración, realizado por diferentes analistas y días. En ambos casos se determinó el coeficiente de variación de los resultados.

Criterios adoptados: El coeficiente de variación (CV) para la repetibilidad $CV \leq 1,5\%$ y para la precisión intermedia $CV \leq 3\%$. Para evaluar la precisión intermedia se usó, además, el Test de Cochran, el Coeficiente de Variación de *Horwitz* y un análisis de varianza.

Exactitud

PROCEDIMIENTO: Se utilizó el método de adición del patrón. Las muestras (concentración 100%) se analizaron por triplicado, aplicándoles el procedimiento de muestra y la reacción colorimétrica descrita en cada técnica. Para ello se adicionaron a una cantidad conocida de la muestra (10 μL) cantidades crecientes de patrón. Se realizaron tres réplicas de cada una de las concentraciones añadidas. Las concentraciones añadidas y recuperadas se representaron en un gráfico y se evaluó el recobrado comparando la pendiente del mismo con un valor de pendiente 1 (*Fernández A., 1996*). Además, se calcularon los porcentajes de recuperación para cada una de las muestras analizadas. Este parámetro se desarrolló solo en la técnica espectrofotométrica.

Criterio adoptado: Recobrado en el intervalo 97–103% (*Fernández A., 1996*).

Especificidad

PROCEDIMIENTO: Para evaluar este parámetro se llevó a cabo un estudio de las respuestas de los aminoácidos, detectados en la muestra por CCD, como interferencias potenciales en las técnicas. Para ello se prepararon soluciones patrón de los aminoácidos: asparagina, lisina, prolina, hidroxiprolina, y de forma similar, se procedió a realizar la reacción colorimétrica a la muestra problema. Se estudió el comportamiento de absorción en la zona de 300 a 400nm y la respuesta cromatográfica en la técnica HPLC.

Sensibilidad

PROCEDIMIENTO: Se aplicó el método, siguiendo el procedimiento de preparación y derivatización de la muestra descrito para cada técnica. Se realizaron diez determinaciones con concentración 10ppm para la espectrofotometría y 5ppm para la HPLC. El parámetro se evaluó a través del cálculo del límite de detección y de cuantificación.

En todos los casos se calcularon los límites de detección (LD) como la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco (criterio 3σ de la *IUPAC*) (*Thompson M, 1995; ICH, 1996 y Thompson M. y col. 1999*;) bajo las condiciones experimentales óptimas.

Se tomó como límite de cuantificación (LC) la concentración de analito que produce una señal igual a diez veces la desviación estándar del blanco (*Thompson M, y Word R., 1995; ICH, 1996; Eurachem, 1998; Thompson M. y col., 1999*) bajo las condiciones experimentales óptimas.

Una vez calculados los LD y LC se comprobaron los mismos, aplicando las dos técnicas evaluadas.

2.6. Ensayos físico-químicos para los estudios de preformulación del polvo

Los estudios de preformulación se realizaron utilizando el polvo II.

2.6.1. Determinación de la distribución de tamaño de partículas

Se determinó según lo descrito por *Alfred Dar, 1981*, seleccionándose los tamices según la clasificación propuesta por la farmacopea norteamericana y se tuvo en cuenta las características que posee el polvo (tamaños de partículas menores de 0,425 mm). Se pesó 100 g de muestra y se transfirió a un juego de tamices, previamente tarados, con aberturas de malla: 425; 355; 300; 250; 212; 180; 150; 125; 106; 090; 063 μm y el colector. Este juego de tamices se colocó en un vibrador en posición 7, durante 15 minutos. Concluido este tiempo los tamices se pesaron y se calculó el porciento, por diferencia de masa, la cantidad de muestra retenida en cada tamiz. Se realizaron cinco réplicas y se determinó el diámetro medio aritmético de las partículas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Diámetro medio} = \frac{\sum d.m}{m_t}$$

Donde:

d: Abertura media entre el tamiz superior y el inferior, mm

m: Masa retenida de polvo en cada tamiz, g

m_t : Masa total de polvo, g

2.6.2. Determinación de la humedad residual del polvo

A una muestra de 5 g se le determinó la humedad residual en una balanza de humedad *Sartorius*, aproximadamente, durante cinco minutos a 105 °C. Se realizaron diez réplicas y los valores se expresaron en porciento (%).

2.6.3. Estudios de higroscopicidad.

Estos estudios se realizaron por dos metodologías, se realizaron cinco réplicas y las muestras se colocaron en desecadoras con los ambientes de humedad sugeridos en cada metodología:

Metodología I (Descrita en la *Eur. Ph., 1999*), que define la higroscopicidad basándose en el método estático. La muestra, aproximadamente 1g, se almacenó 24 horas a 80% de humedad relativa y Temperatura 25°C, se determinó el incremento en masa por el método gravimétrico. El ensayo se realizó por triplicado

Metodología II: (Sugerida por *Callagan JC. Y col., 1982*) que establece la clasificación de la higroscopicidad por determinación del Contenido de Humedad de Equilibrio (CHE). La muestra, aproximadamente 1g, se almacenó a diferentes ambientes de humedad relativa entre 8,5 y 97,5 y temperatura 25°C hasta peso constante. Los ambientes de humedad relativa, 8,5; 18,8; 37,1; 47,2; 58,3; 70,4; 80,5; 88,8; 93,9 y 97,5 % se

obtuvo con mezclas de ácido sulfúrico: agua según lo descrito en la USP XXIII, 1995. Se determinó el CHE a través de la siguiente expresión:

$$CHE = \frac{P}{P + 100} \times 100$$

Donde:

P: Porcentaje de Humedad (Base seca)

Ambas clasificaciones aparecen referidas en la Tabla 2.2. El contenido de humedad de las muestras, que se expresa en unidades de porcentaje (%), se determinó a partir de las variaciones de masa experimentadas por las mismas.

Tabla 2.2. Clasificación de la higroscopicidad

Clasificación, según la guía técnica de la Farmacopea Europea, 1999, p.86.	
Denominación:	Fundamento:
Ligeramente higroscópico	0.2% ≤ incremento en masa < 2%
Higroscópico	0.2% ≤ incremento en masa < 15%
Muy Higroscópico	incremento en masa ≥ 15 %
Delicuescente	Suficiente agua es absorbida para formar un líquido
Clasificación de la higroscopicidad, según Callaghan, Drug Dev. Ind. Pharm. Vol.8, pp 355-368.	
<u>Clase 1:</u> No higroscópico	No ocurre incremento de humedad a humedades relativas por debajo de 90%
<u>Clase 2:</u> Ligeramente higroscópico	No ocurre incremento de humedad a humedades relativas por debajo de 80%
<u>Clase 3:</u> Moderadamente higroscópico	El contenido de humedad no debe incrementarse mas de 5% después del almacenamiento por una semana a humedades relativas por debajo del 60%
<u>Clase 4:</u> Muy higroscópico	El incremento en el contenido de humedad puede ocurrir a humedades relativas por debajo de 40 a 50%.

2.6.4. Determinación de la fluidez del polvo

Para caracterizar el flujo del polvo se utilizaron tres procedimientos de medición: Mediciones angulares y de compactación, Usando el equipo *Hosokawa PT-E*; la determinación del índice de compresibilidad y el índice de Hausner (incluyen mediciones de compactación) y las Medidas en la Célula de Cizalla

✚ Medidas en el Hosokawa: Se utilizó el equipo *Hosokawa Micron Power System, Summit, NJ*, de ensayo de polvos. Como métodos angulares se incluyó la medición de los ángulos de reposo y de espátula y como método de compactación se incluyó la determinación de la compresibilidad. Los valores medios obtenidos en cada parámetro se evaluó individualmente y como un todo, utilizando la tabla de fluidez de Carr, (Tabla 2.3, Anexo D) para definir el grado de fluidez del polvo. En todos los casos se triplicaron los ensayos.

- ✓ Ángulo de reposo: Se tamizó el polvo dejándolo caer a través de un embudo que posibilita formar una pirámide encima de una placa metálica circular. Con ayuda de un aditamento, dotado de un semicírculo, se midió el ángulo formado por el polvo.
- ✓ Ángulo de espátula: Se dejó caer una cantidad abundante de polvo sobre una espátula, situada sobre una bandeja metálica, propiciando la caída de la misma. Luego se midió el ángulo del polvo que quedó encima de la espátula, al inicio, en el centro y al final; el promedio de los tres es considerado el ángulo de espátula.
- ✓ Compresibilidad: Se llenó de polvo el recipiente destinado para esta prueba, se enrasó y se pesó, ajustándose en su parte superior un cilindro plástico para el suministro adicional de polvo. El recipiente se colocó en el equipo que funcionó durante 20 minutos a una velocidad de 50 golpes por minuto (*Thompson F, 1984*), con los valores de la masa de la muestra (*M*, en g) *inicial* y *final* se calculó el porcentaje de compresibilidad (*C*) utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{M_{\text{final}} - M_{\text{inicial}}}{M_{\text{final}}} \cdot 100$$

El análisis de estos resultados se realizó utilizando la Tabla 2.2, de parámetros que afectan los índices de fluidez de Carr, reportada por Nagel K., 2003 (Tomado de Carr R. 1965), que sirvieron de base para desarrollar el equipo Hosokawa, usado en la medición de estas propiedades.

Tabla 2.2. Parámetros que afectan el índice de fluidez de Carr, según Nagel K., 2003, p.281.

Grado de fluidez	Índice de fluidez	Angulo de reposo (°)	Compresibilidad (%)	Angulo de espátula (°)	Uniformidad (no.)
<i>Excelente</i>	90-100	25-30	5-10	25-31	1-5
<i>Bueno</i>	80-89	31-35	11-15	32-38	6-8
<i>Suficiente</i>	70-79	36-40	16-20	39-45	9-12
<i>Aceptable</i>	60-69	41-45	21-25	46-60	13-17
<i>Malo</i>	40-59	46-55	26-31	61-76	18-22
<i>Muy malo</i>	20-39	56-65	32-37	76-90	23-7
<i>Muy muy malo</i>	0-19	66-90	>38	>91	>36

- ✚ Determinación del Índice de Compresibilidad y de Hausner: Estas mediciones incluyeron la determinación previa de las densidades aparente y real.
- ✓ Densidad Aparente de vertido y de asentamiento: Se determinó empleando el método de la probeta: A una probeta graduada se le adicionó 50 g del polvo, pesados en una balanza con una precisión de 0,001 g y se midió el volumen ocupado por esa cantidad de polvo, determinando la densidad

aparente de vertido. A continuación la probeta se dejó caer 50 veces desde una altura constante sobre una superficie blanda, se determinó el volumen ocupado por el polvo y se determinó la densidad aparente de asentamiento. Ambas densidades se determinaron mediante la relación de masa/volumen ocupado y se expresó en g/cm³. Los resultados son el promedio de diez determinaciones.

- ✓ Densidad Real: Se empleó un Pignómetro de Helio (*Quantachrome Corporation, MPY-Z*), que permite obtener los términos P₁ (cantidad total de H_e) y P₂ (cantidad de H_e que penetra en la muestra). Para calcular el volumen muestra (V_M) se utilizó la siguiente ecuación, que a su vez da la posibilidad de determinar la densidad real por la fórmula tradicional:

$$V_M = 6,99 - \left\{ 5,79 \cdot \left[\left(\frac{P_1}{P_2} \right) - 1 \right] \right\}$$

Aplicando la técnica anterior se realizaron cinco réplicas, que constituyen a su vez la media de tres determinaciones.

Determinación del Índice de Compresibilidad de Carr y de Hausner

Estos índices se expresaron en (%) y se determinaron mediante las siguientes fórmulas descritas por *Wells, 1998*.

$$\text{Índice}_{\text{Hausner}} = \frac{D_a}{D_{ap}}$$

$$\text{Índice}_{\text{Carr}} = \frac{D_a - D_{ap}}{D_a} \cdot 100$$

Donde:

D_a: Densidad aparente de asentamiento, g/cm³

D_{ap}: Densidad aparente de vertido, g/cm³

Nota: Los resultados deben compararse con los siguientes límites, según cada caso:

Límites del Índice de Carr:

5-15% Excelente

12-16% Bueno

18-21% Regular

23-35% Malo

El índice de Hausner debe ser: < 1,25.

- ✚ Medidas de Fuerza de Cizalla: Se utilizó un equipo IPT RO-200 automático dotado de célula de cizalla rotatoria (*Peshcl LA, 1989*). Cada muestra se sometió a tres niveles de consolidación (20, 35 y 50 g/cm²) que permitieron la obtención de tres familias fuerza normal-fuerza de cizalla. A través de la construcción de los círculos de *Mohr* se estimaron los valores del rendimiento de la fuerza no reducida (f_c), la fuerza de mayor consolidación (σ_i) y la cohesión. A partir de la pendiente de la relación lineal f_c-σ_i para los distintos niveles de consolidación se estimó el factor de flujo (*Williams JC, 1983; Peschl LA, 1989; Amidon*

G, 1999). Para cada muestra se obtuvieron dos réplicas y el flujo se valoró teniendo en cuenta las siguientes estimaciones: con valores resultantes en el intervalo (0–4) fluye mal; en (4,1-9) flujo normal y en (9,1-13) fluye libremente.

2.6.5. Estudio de compatibilidad del polvo con excipientes seleccionados

El estudio se realizó en un equipo de Calorimetría diferencial de barrido *Shimadzu DSC-50*, con un intervalo de temperatura de 0–250 °C, un tamaño de muestra de 10 mg y una velocidad de barrido de 10⁰ /min. Se obtuvieron los termogramas correspondientes a las sustancias auxiliares evaluadas (Eudragit L, Carboximetilcelulosa, Celulosa microcristalina, Lactosa, Estearato de Magnesio, Talco), al polvo y a las mezclas físicas preparadas en la proporción 1:1 para el Eudragit, Lactosa, Carboximetilcelulosa y la celulosa microcristalina mientras que la proporción Polvo:Talco-Estearato fue 5,0: 0,6: 0,25%.

2.6.6. Estudio de estabilidad inicial del estado sólido.

La estabilidad inicial del estado sólido se realizó siguiendo el procedimiento descrito por *Steele G, 2004*, el cual sugiere que el compuesto exactamente pesado debe ser colocado en seis viales de cristal abiertos (en duplicado), durante tres meses a las siguientes condiciones: Luz 5000 lx / 25 °C, 75% de humedad relativa / 40 °C y 60% de humedad relativa / 30 °C. El muestreo se realizó cada 15 días valorando las muestras visualmente y realizando la determinación cualitativa y cuantitativa del metabolito de interés, Cucurbitina, para lo cual se utilizó la CCD y la HPLC con las condiciones cromatográficas descritas en los epígrafes 2.3.1 y 2.4, respectivamente. También se valoraron las características organolépticas de las muestras.

2.7. Evaluación preliminar de los subproductos obtenidos en el Método II.

2.7.1 Determinación de las propiedades físico-químicas (índices de calidad cualitativo) del aceite obtenido a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch

Los ensayos que se detallan a continuación se extrajeron de las farmacopeas, *Eur. Ph., 2005; B.P., 2004*, referidos para el control de calidad de los aceites grasos vegetales, extraídos por compresión.

ENSAYOS

A. Índice de refracción: Se realizó la determinación, utilizando un Refractómetro digital de Abbe, teniendo como condiciones $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en relación a la longitud de onda de la línea D del sodio ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$). Se determina el ángulo límite.

B: Rotación óptica: Se realizó utilizando un Polarímetro. Se determinó el ángulo de rotación, expresado en grados (α), del plano de polarización a la longitud de onda de la línea D del sodio ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) medido a 20 °C usando una capa de 1 dm.

C: Densidad relativa: Se determinó por la relación entre la masa de 2 mL del aceite a 20 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

D: Índice de saponificación:

PROCEDIMIENTO: Se introdujo 3 g del aceite en un matraz de vidrio borosilicatado de 250 mL y acoplado a un condensador a reflujo. Se añadió 25 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 M y algunas perlas de vidrio. Se acopló un condensador y se calentó a reflujo durante 30 minutos. Se añadió 1 mL de disolución de fenolftaleína y se valoró inmediatamente (mientras esté caliente) con HCL 0,5 M (n_1 mL de HCL 0,5 M). Se realizó un ensayo en blanco en las mismas condiciones (n_2 mL de HCL 0,5 M) y se calculó el Índice de saponificación por la siguiente expresión:

$$I_S = \frac{28,05 \cdot (n_1 - n_2)}{M}$$

E: Absorbancia: A 0,1 g de la sustancia a examinar, se le añadió isooctano y se diluyó hasta 30,0 mL con el mismo disolvente. Se desarrolló el espectro de absorción en el rango de longitud de onda comprendido entre 200 y 500nm.

F. Índice de acidez:

PROCEDIMIENTO: Se disolvió 10 g del aceite en 50 mL de una mezcla formada por volúmenes iguales de alcohol y éter (el disolvente debe ser neutralizado previamente con hidróxido de potasio 0,1M en presencia de 0,5 mL de disolución de fenolftaleína). Una vez disuelto, se valoró con hidróxido de potasio 0,1M. La valoración se da por terminada cuando el color rosa persiste durante 15 segundos por lo menos (n mL de hidróxido de potasio 0,1 M). La masa de la muestra (M) se expresó en g. Se calculó el Índice de acidez empleando por la siguiente expresión:

$$I_A = \frac{5,61 n}{M}$$

G. Índice de peróxidos

PROCEDIMIENTO: En un matraz cónico de 250 mL con tapón esmerilado se introdujo 5 g del aceite. Se añadió 30 mL de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético glacial y 2 volúmenes de cloroformo. Se agitó hasta disolver la sustancia y se añadió 0,5 mL de disolución saturada de ioduro de potasio. Se continuó la agitación durante un minuto exactamente y, a continuación, se añadió 30 mL de agua. Se valoró con tiosulfato de sodio 0,01 M, añadido lentamente sin dejar de agitar hasta que la coloración amarilla haya prácticamente desaparecido. A continuación se añadió 5 mL de disolución de almidón y se prosiguió la

valoración agitando energicamente hasta la desaparición de la coloración (n_1 mL de tiosulfato de sodio 0,01 M). Se realizó una valoración en blanco en las mismas condiciones (n_2 mL de tiosulfato de sodio 0,01 M). La valoración en blanco no debe requerir más de 0,1 mL de tiosulfato de sodio 0,01 M. Se calculó el Índice de peróxido por la siguiente expresión:

$$I_P = \frac{10(n_1 - n_2)}{M}$$

En los parámetros D, F y G se determinaron los límites de especificación utilizando el método de Bowker, procesando 25 muestras de dos lotes (*Espinosa M., 1987*).

2.7.2. Análisis bromatológico del subproducto sólido (testa) con vistas a su uso en la alimentación animal.

Este análisis se realizó en el laboratorio de control de la calidad de la fábrica de piensos de Villa Clara e incluyó los ensayos proteínas totales, cenizas, Calcio y Fósforo, siguiendo la metodología descrita en las siguientes normas cubanas (NC): Proteínas (NC- 74-28), cenizas (NC 74-30), Calcio (NC 74-32) y Fósforo (NC 74-33).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Métodos de obtención del polvo a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch

3.1.1. Establecimiento de condiciones para el desarrollo de los métodos de obtención del polvo.

Las semillas evaluadas por especialistas del Centro Provincial de Sanidad Vegetal respondieron al control fitosanitario establecido lo que garantizó una óptima calidad. Se comprobó la composición cualitativa de metabolitos en las semillas, a través de un tamizaje fitoquímico, obteniéndose la presencia de compuestos grasos, triterpenos, esteroides, aminoácidos, proteínas, azúcares reductores, fenoles, quinonas, taninos y resinas; posee, además, aceite secante fijo. Esta caracterización fitoquímica coincide con los estudios realizados en el Departamento de Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, por Saucedo Y. y Rodríguez D., 1995.

Teniendo como objetivo principal la obtención de un polvo con propiedades que permitan su uso como ingrediente activo en formas farmacéuticas, con acción antihelmíntica, se estudiaron dos métodos, (**Método I y Método II**). El **Método I** es el reportado por la *Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba, 1992*. Este método incluye las operaciones de pulverización y tamizado y como resultado de su aplicación se obtuvo como productos un polvo y un producto colateral que incluye testa y almendra.

El **Método II** constituye una propuesta del presente trabajo, al no estar reportado en la literatura para esta planta y fue diseñado con la concepción de llevar a cabo un proceso limpio, es decir se consideró la inclusión de operaciones que permitieran la extracción del aceite y la tradicional separación de testa y almendra, de este modo al culminar el método se dispone de tres productos: polvo obtenido de la almendra, con propiedades antihelmínticas y centro del estudio de la presente tesis, aceite, producto con potencialidad de uso farmacéutico y referido en la literatura para el tratamiento de HBP, así como la testa, de interés en la alimentación animal.

A continuación se detallan los estudios realizados para establecer las condiciones adecuadas en las operaciones incluidas en el Método II:

Decorticado: Un aspecto de interés a tener presente en la obtención del polvo a partir de las semillas de *Cucurbita Moschata Duch* lo constituye, sin duda, el **decorticado** de la semilla (eliminación de la testa), aspecto muy importante si se tiene en cuenta que la Cucurbitina, metabolito responsable de la acción antihelmíntica, presente en las semillas se encuentra mayoritariamente en la almendra (*André P, 1997*) y resultaría imposible realizar esta operación de forma manual.

Este análisis que consistió en determinar, de forma manual, como se comportaba la distribución de almendra y testa en la semilla, permitió conocer la proporción promedio de almendra y testa en la semilla y

Resultados y Discusión

que aparece representada en la [Figura 3.1](#). Es importante destacar que el porcentaje de almendra obtenido incluye el aceite presente en las semillas.

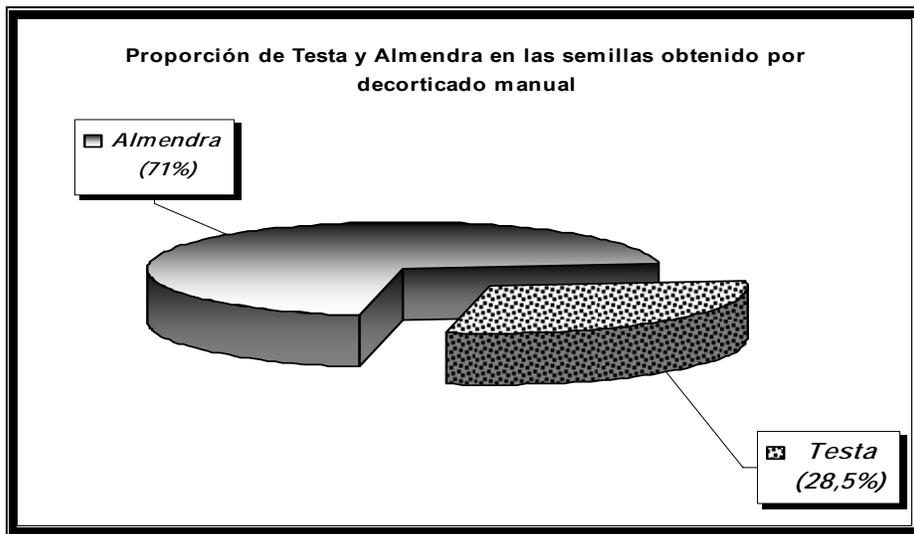


Figura 3.1. Valores medios obtenidos de la distribución de almendras y testa en las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, por decorticado manual.

Secado: Las condiciones de secado se establecieron, en trabajos precedentes por *Jorge E. y Saucedo Y., 1995*), siguiendo las condiciones sugeridas por *Cuellar A., 2000*. Estas incluyeron el método a la sombra, al sol y a la estufa (a 40°C) y los resultados obtenidos avalan el método a la estufa a 40°C, durante 72 horas, para realizar el secado de las semillas.

Desgrase: Fue realizado empleando el método de expresión sugerido por la Eur. Ph., 2005, para la obtención de aceites grasos vegetales, con algunas modificaciones (solo es precedida por la operación de secado). El promedio de porcentaje de aceite extraído resultó ser 31% (determinado en base al peso total de semilla y con cinco réplicas), lo que se corresponde con lo reportado en la literatura que establece que el aceite presente en las semillas de *Cucurbita* Spp se encuentra en un rango del 30 al 40%, *Murkovic M. y col., 1996; Yoinis Y. y col., 2000* y *El-Adawy T. y Taha K., 2001*.

Pulverización y Tamización: Se seleccionó un molino de cuchillas teniendo en cuenta las características del material a moler: testa dura y fibrosa, y almendra blanda y con gran contenido de grasa (*Faulli C., 1993*). Ante lo poco práctico que resultaría el decorticado manual y considerando que la almendra y la testa ofrecen al moler diferente comportamiento (la almendra ofrece tamaños de partículas más pequeños y la testa mayores) se seleccionó el tamiz que propicia el decorticado de la semilla. Tanto la observación visual como el estudio de flotación, cuyos resultados aparecen en la [Figura 3.2](#) permiten asegurar que a tamaños de malla por debajo de 0,425mm ya no aparece testa.

Resultados y Discusión

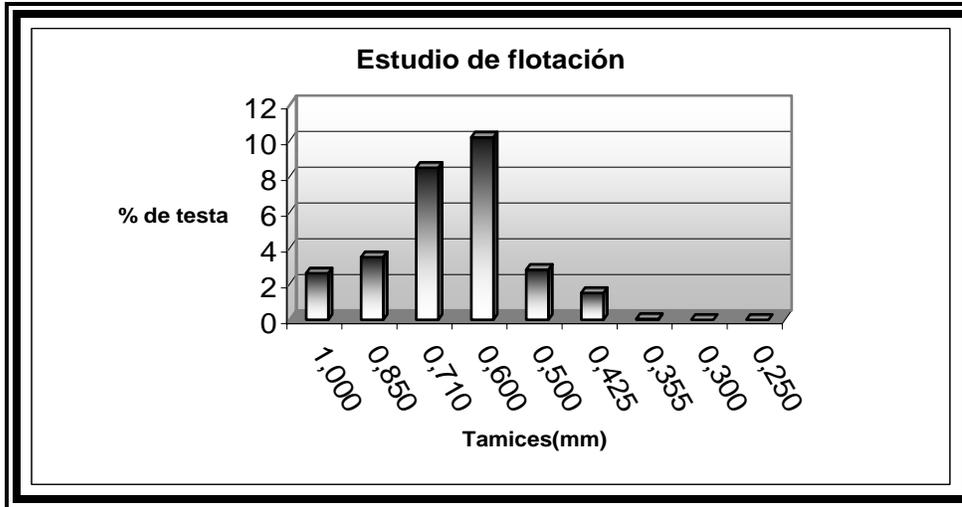
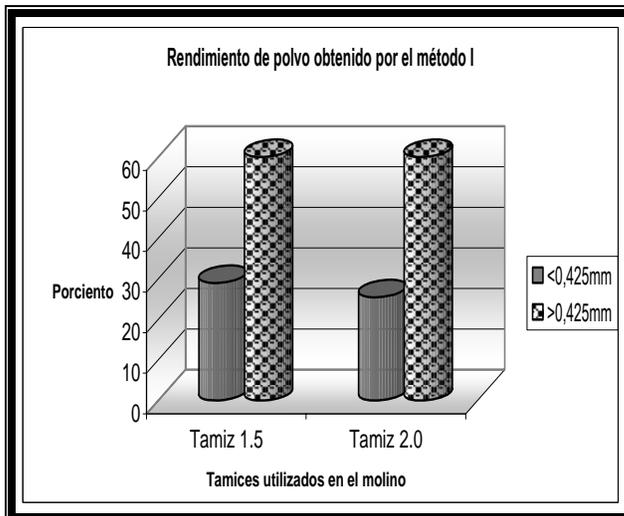


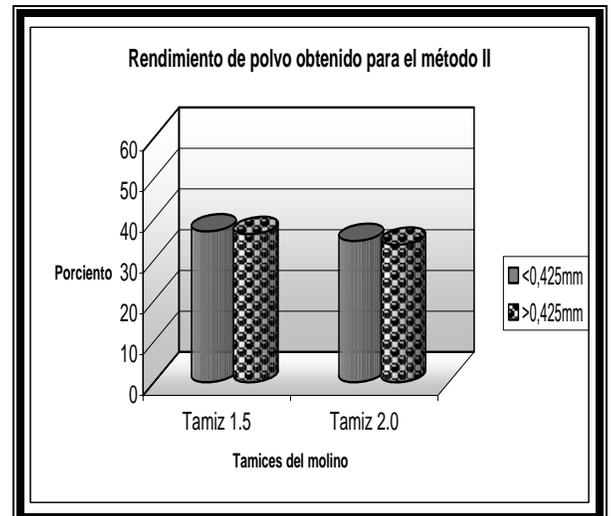
Figura 3.2. Resultados obtenidos en el estudio de flotación para seleccionar el tamiz que propicia el decorticado de la semilla.

Por otra parte en la selección del tamiz adecuado, para colocar en el molino, que se realizó comparando el comportamiento en el porcentaje de sólido obtenido en los intervalos de tamaños de partículas: **(A)** menores de 0,425 mm, **(B)** mayores de 0,425 para ambos métodos, se obtuvo que:

- ✓ El material vegetal ofrece una gran resistencia, durante el proceso de molinado al usar el tamiz 1.0 mm en ambos métodos, más acentuada en el método I, lo que conllevó a descartar su utilización.
- ✓ El porcentaje de polvo en los dos rangos de tamaño de partícula evaluados difiere significativamente al comparar ambos métodos pero si se compara en cada método por separado los resultados aportados por los dos tamices evaluados (1.5 y 2.0 mm) fueron similares (Figura 3.3 **A** y **B**)



A



B

Figura 3.3. Valores medios de % de polvo obtenido utilizando los dos tamices evaluados en el molino y los tamaños de partículas (TP) citados, **A**: para el Método I y **B** para el método II. (Datos tomados de las Tablas A.1 y A.2, respectivamente (*Anexo A*)).

Resultados y Discusión

En la Figura 3.3 **A** se puede apreciar que el método I aporta un mayor tamaño de partícula a los polvos, independientemente del tamiz empleado en el proceso de molinado. Mediante este método el polvo de tamaño inferior a 0,425mm se mantiene cercano al 25% del total, incluyendo el porcentaje de aceite correspondiente. Si se tienen en cuenta que este tamaño de partícula es el que presenta interés para aplicaciones farmacéuticas entonces resulta que el Método I no es ventajoso por proporcionar baja eficiencia.

Por su parte el comportamiento en el porcentaje de polvo obtenido en el Método II, (Figura 3.2 B) denota que hay un incremento en el porcentaje de polvo obtenido en el menor tamaño de partícula, llegando a ser este cercano al 40% lo que se explica por la eliminación previa del aceite, que facilita la pulverización de las semillas. Es necesario destacar que el análisis realizado en este método se realizó después de haber eliminado el aceite que representó el 31% del peso total de semilla evaluado.

Por otra parte, al seleccionar las condiciones para llevar a cabo el molinado de las semillas, se pudo comprobar que no hay diferencias significativas debidas al uso del tamiz 1.5 o 2.0mm, independientemente del método (obteniéndose una $P=0,49$ para el método I y una $P=0,22$ para el método II), por tal motivo puede quedar abierta la selección según las condiciones de trabajo existente.

La comparación del porcentaje de polvo obtenido por cada método, teniendo como patrón el porcentaje de almendra presente en la semilla, aparece en la Figura 3.4. Al analizar la figura se observa en el intervalo de tamaño de partícula inferior a 0,425mm, el de mayor interés para cumplir los objetivos del presente trabajo, que el porcentaje de polvo obtenido por el método I es cuantitativamente muy inferior, con respecto al porcentaje de almendra presente en la semillas lo que permite inferir que en el proceso de tamizado se pierde un gran porcentaje, que, debido a la grasa fundamentalmente, queda con tamaños de partículas superiores o ocurre por ello agrupaciones de partículas. Sin embargo, en el método II se incrementa significativamente este valor y si se tiene en cuenta que el porcentaje de almendra obtenido por el método manual incluye aproximadamente un 31% de aceite, se puede proponer, que de acuerdo a la consistencia y características del material que conforman la almendra, si se selecciona el polvo obtenido a partir de las semillas secas sin decorticar en un intervalo menor de 0,425 mm, se está procediendo al decorticado de la semilla, es decir, en buena medida, que la almendra queda separada de la testa, aunque resulta inevitable una pérdida pequeña de la almendra que sale adherida a la testa.

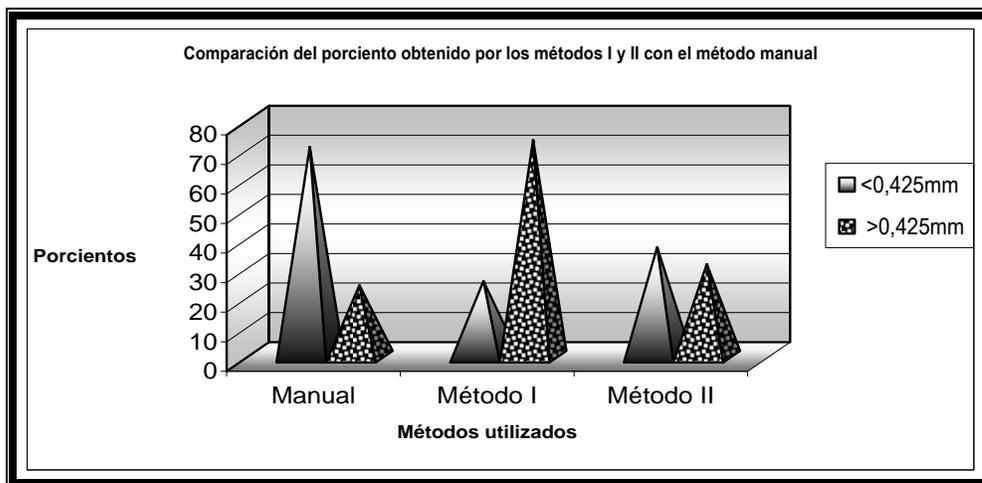


Figura 3.4. Valores medios de porcentaje obtenidos del polvo de semillas decorticadas manualmente y por los métodos I y II.

3.1.2. Comparación de los métodos empleados en la obtención del polvo

La inclusión de las operaciones de secado y desgrase en el método II, así como los productos finales obtenidos, enmarcan las diferencias fundamentales en estos métodos. Este método propicia obtener un producto final adicional, el aceite, lo que se logra gracias al proceso de desgrase. Según la literatura dicho producto posee grandes posibilidades terapéuticas (*Murkovic, 1996; Schiebel-Schlosser G, 1998, Vademecum de Fitoterapia, 2003, Gosesll-Williams M, 2006, entre otros*). Es importante destacar que la eliminación del aceite ofrece grandes ventajas ya que por una parte se logra simultáneamente un incremento en la concentración del metabolito de interés, con la consiguiente eliminación de los componentes solubles en solventes no polares y por otra parte este procedimiento facilita considerablemente las operaciones de pulverización y tamizado que resultan engorrosas en el Método I. Con respecto al porcentaje de polvo, teniendo como referencia el decortinado manual (es decir considerando que la almendra representa el 70% aproximadamente de la semilla), se obtuvo que el porcentaje obtenido por el método II, para el menor tamaño de partículas, supera el porcentaje obtenido con respecto al Método I, esto avala el primero teniendo en cuenta la gran importancia que posee el tamaño de partículas en la evaluación de formas farmacéuticas sólidas. Es importante señalar que resulta inevitable una pequeña pérdida de almendra lo cual está dado por el porcentaje de grasa que queda en el polvo posterior al desgrase y que según reportes de la Farmacopea Europea, 2005, para las semillas puede ser entre un 3 - 6%.

Resultados y Discusión

Según lo expuesto el Método II, evaluado en este trabajo, presenta ventajas con respecto al Método I, sugerido por la *Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos, 1992*, ya que el primero supera al segundo en el porcentaje de polvo obtenido, aporta un producto colateral de interés farmacéutico y sus operaciones facilitan el decorticado, aspecto de vital importancia por la necesidad de eliminar la testa y la imposibilidad de hacerlo de forma manual.

Como resultado del análisis económico se obtuvieron los siguientes valores para el costo de la producción y el valor de la producción para ambos métodos (Tabla 3.1). Se toma como base el procesamiento de 10 Kg de materia prima.

Tabla 3.1. Resultados obtenidos en el cálculo del valor y el costo de la producción para los métodos I y II.

Costo de producción						
			Método I		Método II	
Materia prima			\$660		\$660	
Costo de operación			\$0,023		\$0,071	
Mano de obra			\$60		\$60	
Costo de producción			\$720		\$720,07	
Valor de la producción						
			Método I		Método II	
	Unidad de medida	\$/unidad	Unidades	precio	Unidades	Precio
Polvo	Papelillo	0.10	4166	\$416	6600	660
Aceite	Fco.(120mL)	\$5	-	-	24	120
Testa	Kg	0.27	7.2	1.94	2.8	0.75
Valor total	\$	-	-	417.94	-	780.75

Teniendo en cuenta estos resultados se calculó la ganancia para cada método obteniéndose para la Método I un valor de -302,06 Y para el método II un valor de 59,93, lo que muestra que en el método I no existe ganancia pues el costo de la producción es mayor que el valor de este. Por su parte en el Método II, además, de los papelillos se puede comercializar el aceite con fines farmacéuticos y la testa como alimento animal, por lo que es posible diversificar la producción, eliminar residuos llevándose a cabo un proceso limpio y económicamente viable.

Teniendo en cuenta lo anterior se propone el Método II para la obtención del polvo, a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, que será evaluado como ingrediente activo para su uso en formas sólidas orales, con acción antiparasitaria. La posibilidad de aplicación que poseen los productos colaterales, aceite

y testa, permite afirmar que los procedimientos tecnológicos propuestos pueden servir de base para la implementación de una tecnología limpia.

3.2. Estudios analíticos para establecer los procedimientos de control de calidad del polvo obtenidos a partir de las semillas de Cucurbita moschata Duch

Después de haber realizado un análisis detallado de las monografías analíticas reportadas en las farmacopeas, Eur. Ph., 2005; BP, 2004, para realizar el control de calidad de un ingrediente activo se propone que la monografía del polvo incluya como acápite principales: Información Inicial (Noticias generales, preparación, definición y características); ensayos cualitativos de identificación (descripción microscópica, reacciones calorimétricas y cromatografía en capa delgada); ensayos específicos (pérdida por desecación, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido) y el ensayo cuantitativo. A partir de estas afirmaciones, se diseñaron ensayos cualitativos, que una vez estandarizados y establecidos los límites correspondientes, permitirán proponer la metodología analítica en la monografía del polvo.

3.2.1. Ensayos cualitativos de identificación

a. Descripción Microscópica del polvo: Se apreció la presencia de parénquima lignificado, gránulos de almidón en forma anisotrópica al examinar a la luz polarizada.

La descripción microscópica del polvo obtenido de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch se corresponde con lo descrito por *Guenkov E, 1969* y más recientemente con lo reportado por la *Royal Horticultural Society, 1998*.

- **Determinación cualitativa de los metabolitos de interés para el uso del polvo como antiparasitario**
Se estudiaron reacciones colorimétricas que permitieran evaluar la presencia de proteínas y aminoácidos, como metabolitos mayoritarios, en el polvo. Para determinar la presencia de proteínas se usó la reacción de Folin (*Lowry, 1951*), mientras que en la determinación cualitativa de aminoácidos se consideró emplear la clásica reacción colorimétrica de ninhidrina. Además se identificaron por CCD los aminoácidos mayoritarios presentes en el polvo.

a. Reacción Colorimétrica de Folin: La concentración ensayada resultó ser positiva apareciendo un color azul intenso instantáneo que demora en desaparecer, lo que demuestra la presencia de proteínas en el polvo. Para la determinación del límite de detección, la reacción se desarrolló disminuyendo la cantidad ensayada, en 5 mg cada vez y se obtuvo que la cantidad mínima detectable para esta reacción fue de 10mg, concentración que se declara como límite de detección.

b. Reacción Colorimétrica de ninhidrina: Al igual que en la reacción anterior la cantidad ensayada fue 50 mg en 2 mL de agua, concentración que resultó ser positiva apareciendo un color azul violáceo intenso a

Resultados y Discusión

los dos minutos de calentamiento, este color demora en desaparecer. Es importante precisar que la aparición de un color azul-violáceo persistente, es una evidencia de la presencia de α -aminoácidos, producto de la formación del cromógeno llamado complejo Ruhemann's purple (RP). El color azul aparece en la mayoría de los aminoácidos y una variedad de colores que van desde el amarillo hasta el marrón en un grupo más pequeño que incluye los iminoácidos (*Friedman M., 2004*). La mayor intensidad de la coloración del complejo RP impide la visualización del resto de las coloraciones cuando hay mezclas de aminoácidos como es el caso del polvo que se evalúa. Sin embargo en este caso la reacción resulta de interés para identificar este grupo de metabolitos que incluyen el de mayor interés para la acción antihelmíntica, la Cucurbitina. La determinación del límite de detección, realizado de forma similar que en el ensayo c, arrojó que la cantidad mínima detectable para este ensayo fue de 5mg de polvo.

c. Identificación de la cucurbitina y otros aminoácidos presentes en el polvo, mediante CCD.

La Cromatografía en Capa Delgada, junto con las reacciones de coloración y el análisis microscópico constituyen los ensayos comúnmente utilizados para realizar el control cualitativo de los ingredientes activos de origen vegetal que ya cuentan con monografías analíticas al efecto, reportadas en las farmacopeas vigentes. En este caso y teniendo en consideración que se trata de la evaluación cromatográfica de una mezcla de componentes de naturaleza variada el análisis está dirigido a identificar uno o varios metabolitos de interés detallando todo lo que aparece en la placa una vez que esta es revelada, a lo que se le conoce con el nombre de huella digital del producto. Lo anterior puede ser observado en las monografías de materia prima de origen vegetal que refiere la Farmacopea Europea en su última edición y como ejemplo se pueden citar los polvos de Ajo e Hipericum en los cuales la CCD está dirigida a identificar la presencia de aminoácidos y flavonoides respectivamente.

En el polvo obtenido de la *Cucurbita moschata* Duch resultan metabolitos de interés los aminoácidos, especialmente la cucurbitina a la cual se le atribuye la acción antihelmíntica. A partir de los trabajos publicados por *Duez P. y col., 1988* y *Schenkel F. y col., 1992.*, donde se proponen condiciones cromatográficas para la Cucurbitina sintética, se diseñó la identificación por CCD de los aminoácidos presentes en el polvo. En dicho trabajo se reportan valores de Rf de la Cucurbitina obtenida por síntesis química que sirven como datos de referencia muy valiosos ante la carencia de este producto como patrón comercializable. Además, con vistas a valorar todas las manchas obtenidas para la muestra se evaluó el comportamiento de 12 patrones de aminoácidos, tomándose como criterios fundamentales de evaluación: El valor de Rf reportado para la Cucurbitina obtenida por síntesis química, los valores de Rf de los patrones

Resultados y Discusión

coincidentes o no con los valores obtenidos para las manchas de la muestra y la coloración de la mancha, aspecto relacionado con la formación o no del complejo RP al reaccionar con la ninhidrina

La [Tabla 3.2](#) muestra los valores Rf obtenidos para cada aminoácido patrón, para la Cucurbitina y para cada una de las manchas obtenidas en la muestra; con lo cual se realizó una asignación aproximada de cada mancha en la muestra.

Tabla 3.2. Valores de Rf obtenidos para los patrones de aminoácidos evaluados utilizando las condiciones cromatográficas y para la muestra.

Aminoácido	Valores de Rf
L-Lisina	0,16
Cucurbitina	0,23
Asparagina	0,37
Prolina	0,46
Glicina	0,47
Hidroxiprolina	0,50
Alanina	0,57
Treonina	0,59
Tirosina	0,65
Valina	0,70
Leucina	0,74
Triptófano	0,75
Fenilalanina	0,82
Muestra	0,23 (Cucurbitina) 0,38 (Asparagina) 0,47 (Glicina, Prolina, Hidroxiprolina) 0,57 (Alanina, Treonina) 0,75 (Leucina, Triptófano,)

Teniendo en cuenta los valores Rf de los aminoácidos patrón y de las manchas de la muestra se puede descartar la presencia de lisina, tirosina, valina y fenilalanina, mientras que las manchas tres, cuatro y cinco poseen más de una asignación por la similitud en los valores de Rf de los aminoácidos asignados en cada caso, siendo necesario recurrir a otras evidencias para su asignación definitiva.

La [Figura 3.5\(A\)](#) muestra la placa obtenido para la muestra donde se observaron cinco manchas, es importante destacar que dichas condiciones permiten obtener manchas con una adecuada separación y nitidez lo que da la posibilidad de mostrar el cromatograma como vía de identificación del polvo, es decir se puede presentar dicho cromatograma como la huella digital del mismo, además se destaca la mancha color café con Rf = 0.23 correspondiente a la Cucurbitina(coincidiendo con los resultados obtenidos por *Duez P, 1988* y *Schenkel F, 1992*, para la Cucurbitina obtenida por vía sintética), aspecto de vital importancia en la

Resultados y Discusión

evaluación del polvo si se tiene en cuenta que este es el metabolito responsable de la acción antihelmíntica.

Por su parte la [Figura 3.5\(B\)](#) muestra el resultado obtenido al realizar la cromatografía bidimensional para la muestra. Al observar la placa podemos afirmar que cada mancha corresponde a una sola sustancia, es decir no hay solapamiento, además, se ratifica lo observado en la cromatografía unidimensional en cuanto a la coloración de las manchas.

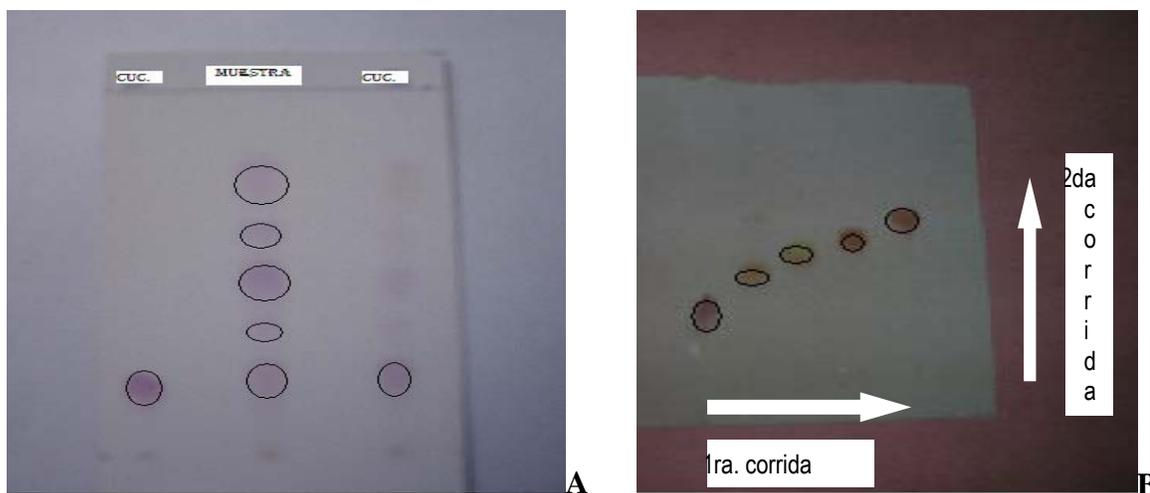


Figura 3.5 A: Placas de CCD de la muestra usando como Soporte la Silicagel GF, como Fase Móvil Metanol: Cloroformo: Amoniac 25% y Acido Acético (80:10:8.5:1.5) y como revelador una solución de ninhidrina 2%.

B: Placa obtenida en la cromatografía bidimensional de la muestra.

Finalmente se valoró la coloración obtenida en las manchas de la muestra y de los patrones al reaccionar con la ninhidrina, aspecto directamente relacionado con la formación del complejo RP responsable de la coloración azul violáceo de la clásica reacción de ninhidrina. Una gran cantidad de reportes en la literatura muestran la existencia de un grupo de compuestos que forman color con la ninhidrina sin formar este complejo, así se citan los Iminoácidos (Acido pipercolico, prolina, hidroxiprolina); aminas aromáticas (anilina); aminoácidos polifuncionales (arginina, asparagina, cisteina, triptófano), entre otros, que se condensan con ninhidrina para formar “productos anormales”, a cuyas reacciones se le suele llamar reacciones de ninhidrina no clásicas (Friedman M., 2004). Estos estudios ayudan a justificar las asignaciones realizadas en las manchas de la muestra empleando los valores R_f ya que la primera mancha cuando la placa es calentada durante media hora aproximadamente se tornan de color pardo, color característico de la Cucurbitina; la segunda mancha posee un color amarillo-parduzco que se corresponde con la coloración que ofrece la asparagina en presencia de la Ninhidrina, mientras la tercera mancha se muestra de color amarillo, característico de la prolina, y las manchas cuatro y cinco se presentan de color azul-violeta indicando la formación del complejo RP.

María Elisa Jorge Rodríguez

Resultados y Discusión

En resumen el análisis realizado permitió demostrar que en el polvo están presentes tanto aminoácidos que forman el complejo como los que no lo forman, lo que ratifica la evidencia experimental descrita en la reacción colorimétrica de ninhidrina. Por otra parte la identificación de la Cucurbitina en la muestra resulta de gran importancia y puede constituir una evidencia a tener presente en el ensayo de identificación para realizar el control de la calidad del polvo. Resulta también importante la presencia de la prolina y asparagina, con características estructurales similares a la Cucurbitina ya que estos aminoácidos pudieran ser valorados para su uso como patrones analíticos en la determinación del contenido de aminoácidos, que reaccionan de forma similar a la Cucurbitina con la ninhidrina, en el polvo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede proponer, como evidencias del ensayo de CCD en el control de la calidad del polvo, que el cromatograma (huella digital) de la muestra se presenta con cinco manchas. La primera mancha color café, con valor de $R_f=0.23$. La segunda mancha tenue, de color amarillento y con valor de $R_f=0,38$ correspondiente a la asparagina. La tercera mancha intensa de color amarillo, con valor $R_f= 0.47$ correspondiente a la Prolina, mientras que la cuarta y la quinta mancha son de color azul intenso con valores de R_f de 0,60 y 0,75 respectivamente. Además se propone que sean utilizados como sustancias de referencia la asparagina, la prolina, cuyos valores de R_f se corresponden con los valores de R_f de la segunda y la tercera mancha, respectivamente, quedando las restantes a ser comprobada a través de los valores de R_f que poseen cada una. En esta selección se tuvo en cuenta, además, que la asparagina es uno de los aminoácidos más abundantes en las semillas de *Cucurbita moschata* y *máxima* (Dunnill M y Fowden L., 1965) y que la prolina posee valores de R_f más cercano, que la hidroxiprolina, a la tercera mancha de la muestra.

3.2.2. Determinación de los límites de especificación de las pruebas específicas

La determinación de los límites de especificación permite disponer de valores establecidos y confiables que formaran parte de la monografía de control de la calidad del polvo. En cada ensayo se procesaron 25 muestras, y los resultados aparecen en las Tablas B.1, B.2 y B.3 (Anexo B) y cálculos estadísticos, usando el método de Bowker (Espinosa M, 1987) permitieron determinar el límite superior de especificación. Un resumen de los valores obtenidos para los tres ensayos, se muestra en la Tabla 3.3.

Al comparar los mismos con los valores registrados para ingredientes activos, de origen natural, reportados en las farmacopeas actuales se puede afirmar que, hay total correspondencia. La Tabla B.4, (Anexo B), contiene valores registrados por la *Eur. Ph., 2005; B.P., 2004* para ingredientes activos (polvos) que provienen de diferentes partes de la planta medicinal de la cual se obtienen. Dichos valores difieren significativamente de los ingredientes activos sintéticos lo que se explica, fundamentalmente, por la

Resultados y Discusión

composición variada que poseen los de origen natural que incluye en su generalidad compuestos orgánicos e inorgánicos.

Tabla 3.3. Resultados obtenidos en la determinación de los límites de especificación para los ensayos específicos que formaran parte de la monografía de calidad del polvo.

Parámetro	X±SD	LSE
Pérdida por desecación (%)	6,25 ± 0,13	6,66 (No mayor que 7)
Cenizas Totales (%)	6,54 ± 0,29	7,50 (No mayor que 8)
Cenizas insolubles en HCL (%)	2,27 ± 0,34	3,37 (No mayor que 3)

X: Media de 25 determinaciones; SD: Desviación Standard; LSE: Limite superior de especificación.

3.2.3. Evaluación de la técnica espectrofotométrica UV-VIS para su uso como ensayo cuantitativo.

3.2.3.1. Establecimiento de condiciones experimentales de la técnica

Teniendo en cuenta que los aminoácidos constituyen los metabolitos de mayor interés presentes en el polvo objeto de estudio y además, el amplio uso que posee la reacción de ninhidrina para la detección de estos compuestos a continuación se presentan estudios analíticos que permitieron establecer las condiciones idóneas para aplicar esta reacción en la identificación y cuantificación de aminoácidos presentes en el polvo usando la Espectrofotometría UV-VIS. Como patrón analítico se utilizó la asparagina cuya selección obedece a varias razones: La Cucurbitina, metabolito responsable de la acción antihelmíntica, no se comercializa lo que dificulta su uso como patrón analítico; La asparagina se valoró dentro de los aminoácidos presentes en el polvo por CCD y manifestó, a diferencia de la prolina y la hidroxiprolina características de absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$) similares a la muestra bajo las condiciones estudiadas, además, posee similitud estructural y química con la Cucurbitina. Esta técnica incluyó una reacción colorimétrica previa de los aminoácidos usando la ninhidrina como agente cromogénico. Se aprovechó la diferencia en la coloración que aporta esta reacción para un pequeño grupo de aminoácidos, incluidos los pirrolidínicos y la asparagina, lo que permite realizar la determinación a 320nm. Esto último incrementa la especificidad de la técnica para estos aminoácidos si se tiene en cuenta que la ninhidrina ofrece una coloración azul intensa, con el resto de los aminoácidos, cuyo máximo de absorción es a 570nm.

Según la literatura consultada la reacción de ninhidrina se ve afectada por varios factores que provocan variaciones en la intensidad y estabilidad del cromógeno formado, tales como la temperatura, el tiempo de calentamiento y la estabilidad del color una vez que se detiene la reacción (*Jones D. y col., 2002; Moulin M y col., 2002 y Friedman M, 2004*, entre otros). Con vistas a valorar el comportamiento de la absorbancia al variar estos factores se realizaron los estudios que se muestran a continuación:

Resultados y Discusión

A). El Comportamiento de absorción de la muestra con los cambios de temperatura aparece reflejado en la [Figura 3.7](#). Como se puede observar bajas temperaturas, por debajo de 40°C y altas, por encima de 60°C producen cambios significativos en la absorción, obteniéndose una meseta en el intervalo comprendido entre estas dos temperaturas. El estudio se realizó fijando el tiempo de calentamiento (20 minutos) y realizando las lecturas a los 5 minutos después de terminada la reacción.

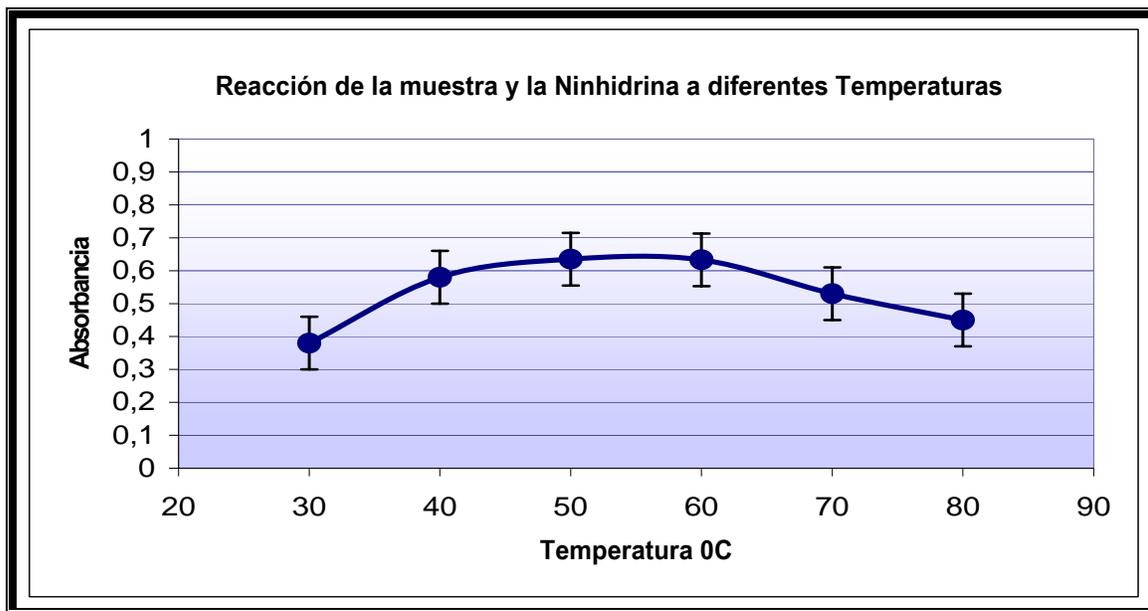


Figura 3.7. Comportamiento de los valores de absorción al aumentar la temperatura utilizada durante el desarrollo de la reacción colorimétrica. (Datos tomados de la [Tabla C.1 \(Anexo C\)](#)).

B). El comportamiento de la Absorbancia de la muestra al variar el tiempo de calentamiento aparece descrito en la [Figura 3.8](#). El estudio se realizó para el rango de Temperatura obtenido en el ensayo anterior como más estable (Desde 40°C a 70°C) realizando las lecturas a los 5 minutos después de terminada la reacción. De la gráfica se pueden realizar las siguientes observaciones: El tiempo de calentamiento necesario para lograr los valores más altos de absorción va disminuyendo con el aumento de la temperatura por lo que el menor tiempo es requerido para la temperatura 70°C. Por su parte los valores de absorción aumentan con la temperatura hasta 60°C. Sin embargo a partir de 70°C comienzan a disminuir los valores de absorción, con respecto a la temperatura anterior, cuya disminución se acentúa a medida que aumenta la temperatura, esto último pudiera estar dado por una inestabilidad del cromógeno a esas temperaturas.

Resultados y Discusión

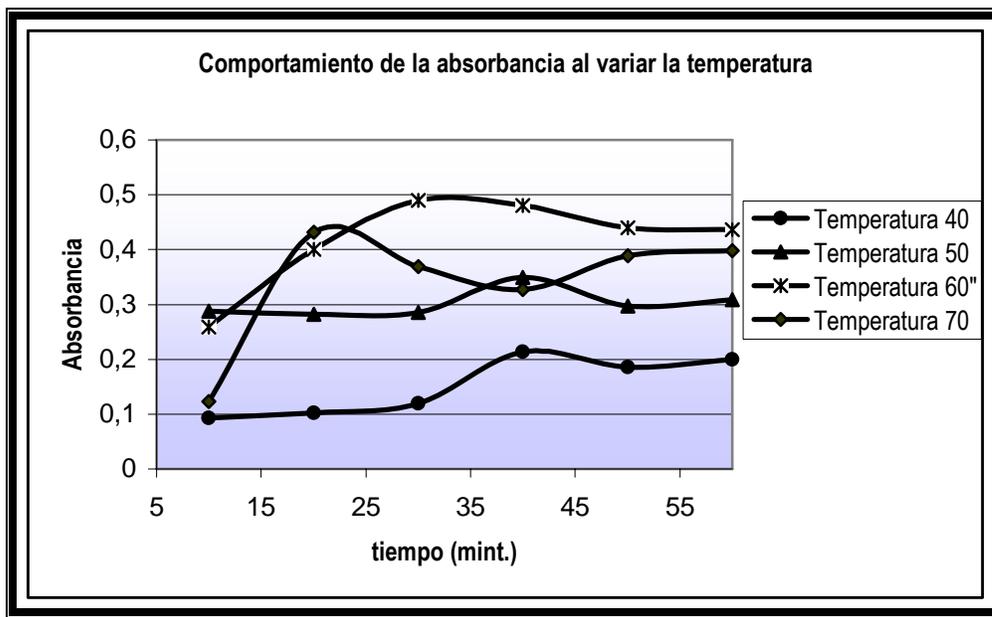


Figura 3.8. Comportamiento de los valores de absorbancia al aumentar el tiempo de calentamiento para las diferentes temperaturas evaluadas. (Datos tomados de la [Tabla C.2 \(Anexo C\)](#))

C) Con vistas a evaluar la estabilidad del color obtenido en la reacción de ninhidrina se realizaron mediciones durante 45 minutos con un intervalo de 5 minutos. Como se observa en la [Figura 3.9](#), una vez que se desarrolla la reacción de ninhidrina hay una estabilidad del color durante los primeros 15 minutos donde se producen ligeras variaciones en los valores de absorbancia. Sin embargo, a partir de este tiempo ocurre una disminución acentuada de este parámetro.

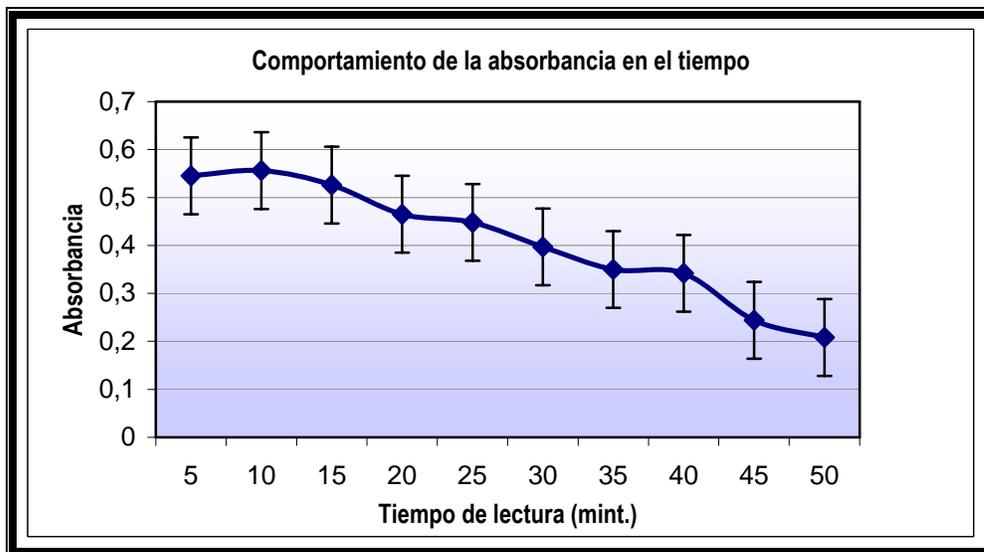


Figura 3.9. Comportamiento de la absorción con el aumento del tiempo de lectura. (Datos tomados de la [Tabla C.3 \(Anexo C\)](#))

Resultados y Discusión

Finalmente se realizó un análisis de los aminoácidos evaluados en la Cromatografía en Capa Delgada con vistas a la selección de uno de ellos para su uso como patrón analítico. De los aminoácidos estudiados se tomaron en consideración aquellos que reaccionaban de forma similar a la Cucurbitina, ante la reacción de ninhidrina, es decir no formaban el complejo RP; en este caso se encontraba la prolina, hidroxiprolina, lisina, y la asparagina

El análisis consistió en valorar el espectro de absorción que presentaban estos aminoácidos, en el rango de 300 a 400nm, con vistas a compararlo con la muestra, teniendo en cuenta que el espectro de la misma aporta una $\lambda_{\text{máx}}$ de 320nm. La [Tabla 3.4.](#) muestra la $\lambda_{\text{máx}}$ de los aminoácidos seleccionados, la Prolina e Hidroxiprolina presentan una $\lambda_{\text{máx}}$ aproximado de 350nm, mientras que la Lisina muestra un espectro con una $\lambda_{\text{máx}}$ difícil de definir entre 320 y 340nm.

Por su parte la asparagina posee un espectro muy parecido a la Cucurbitina y a la muestra coincidiendo con su $\lambda_{\text{máx}}$ de 320nm. Todo lo anterior permite la selección de la asparagina como patrón analítico en la determinación cuantitativa de los aminoácidos del polvo.

Tabla 3.4. Máximos de absorción de los aminoácidos evaluados después de haber realizado la reacción de ninhidrina

Aminoácidos	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Lisina	330-350
Asparagina	320
Prolina	350
Hidroxiprolina	350
Cucurbitina	320
Muestra	320

Lo anterior justificó la aplicación de un diseño factorial 2^3 con vistas a precisar las condiciones óptimas para desarrollar dicha reacción. Los estudios preliminares ayudaron a la selección de los niveles en cada una de las variables que se incluyeron en el diseño de experimentos con vistas a establecer las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica. La temperatura incluyó como valor mínimo 40°C y como valor máximo 60°C. Por su parte el tiempo de calentamiento no debe ser menor de 10min. ni mayor de 40min., mientras que el tiempo de lectura se incluyó en el diseño con 5min. como valor mínimo y 15min. como valor máximo (tiempo considerado después de haber detenido la reacción). Estos valores permitieron desarrollar un diseño experimento 2^3 usando la matriz descrita en la [Tabla C.4 \(Anexo C\)](#), en la cual aparecen los resultados obtenidos en la variable respuesta utilizada, la absorbancia.

La información ofrecida por el diseño, al procesar dichos resultados, usando el paquete estadístico *Statgraphics versión 4.1, 1999*, se recoge en la [Tabla C.5 \(Anexo C\)](#). El análisis de varianza muestra que los tres parámetros incluidos en el diseño son estadísticamente significativos con valores de probabilidad

Resultados y Discusión

menores que 0,05, para un nivel de significación del 95%. El valor obtenido para r resultó ser muy bueno ya que el modelo obtenido explica el 97,99 de las variabilidades de la absorbancia., mientras que el Test de *Durbin-Watson* aportó un valor superior a 1,4 lo que indica que no hay serios autocorrelaciones en los residuales. Para la optimización del modelo se utilizó el método ascendente y los resultados muestran que los valores óptimos de trabajo para desarrollar la reacción de ninhidrina, con vistas a su uso en la técnica espectrofotométrica, son: Temperatura 60°C, tiempo de calentamiento 40 minutos y tiempo de lectura 10 minutos.

Después de establecidas las condiciones para el desarrollo de la técnica espectrofotométrica se determinó, usando las condiciones evaluadas, la absortividad específica de la asparagina con vistas a establecer un procedimiento de cálculo sencillo y que estuviese acorde con el establecido por las farmacopeas para determinar el contenido total de aminoácidos en el polvo, en base a la asparagina.

La [Figura 3.10](#) muestra la curva de calibración realizada para determinar el valor de dicho parámetro, el cual se corresponde con la pendiente de dicha curva dividida por la masa molar de la asparagina.

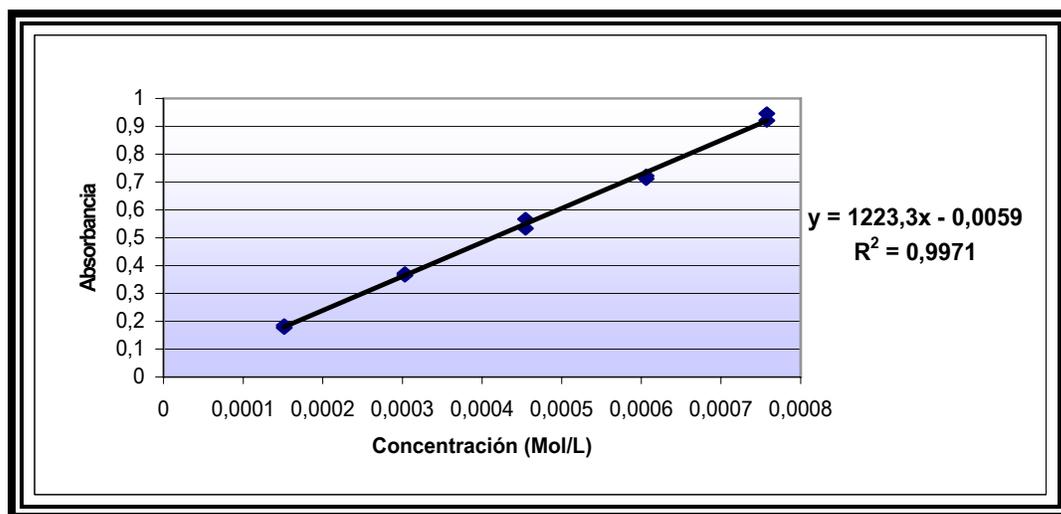


Figura 3.10. Curva de calibración realizada para determinar la absortividad específica de la asparagina.

Con el valor de absortividad obtenido se realizó el procedimiento de cálculo correspondiente, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, y esto permitió proponer la ecuación que permite calcular el contenido (%) de aminoácidos, calculado en base a asparagina, presente en el polvo evaluado y que aparece descrita en el *epígrafe 2.3.3*.

Resultados y Discusión

Una vez que el método fue puesto a punto se procedió a su validación para lo cual se usó la metodología descrita por las *normas ICH, 1996*, las cuales sugieren la evaluación de los parámetros linealidad, precisión, exactitud, especificidad y sensibilidad.

3.2.3.2. Validación de la técnica colorimétrica

✓ Linealidad

La Figura 3.11 muestra la curva de calibración obtenida al evaluar el parámetro linealidad en la técnica espectrofotométrica usada para la determinación de los aminoácidos en el polvo, en base a asparagina. Los criterios estadísticos utilizados para evaluar el parámetro aparecen en la Tabla C.6 (Anexo C). Si se comparan los valores obtenidos en cada parámetro con los criterios establecidos por las *normas ICH, 1996*, se puede afirmar que en todos los casos se encuentran dentro rango especificado. La ecuación de la recta obtenida fue **Abs= 0,0093 Conc - 0,0127** con un coeficiente de correlación de 0,99, un coeficiente de variación de los factores respuesta 3,970 (inferior al 5%) y una desviación Standard de la pendiente, 0,032, que es menor que el 2%. La fiabilidad de la ecuación se evaluó, además, a través del error típico cuyo valor es muy inferior a la desviación Standard de la variable Y. Con vistas a corroborar los resultados anteriores se realizó un análisis de varianza en el cual se obtuvo un valor de 4033 (F mucho mayor que el F crítico), estadísticamente significativo. Sin embargo el valor del coeficiente de calidad es muy inferior a 2,5 (9,33 E-07) por lo que se puede plantear que el método es lineal en el rango de concentración evaluado.

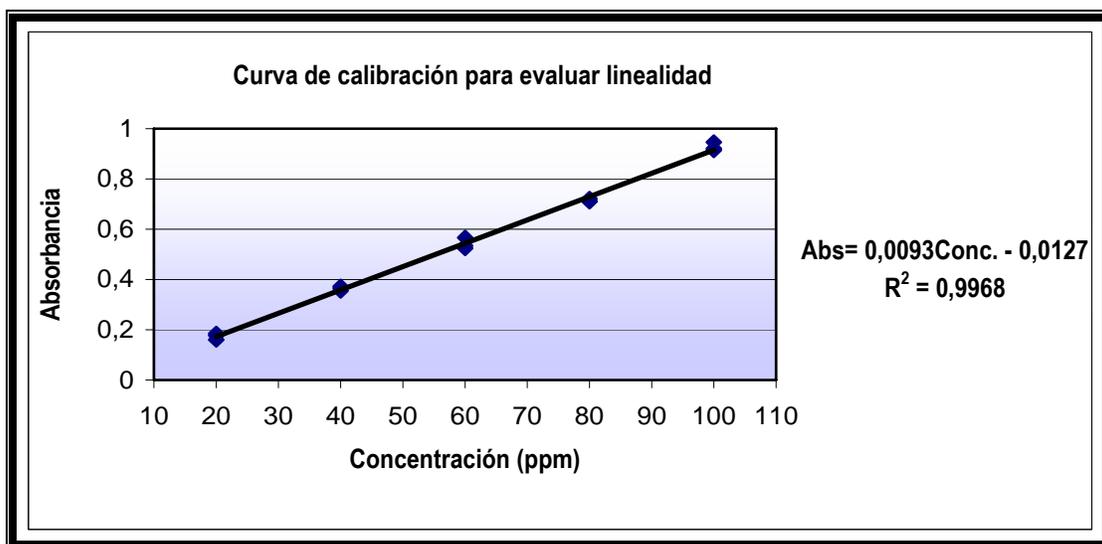


Figura 3.11. Curva de calibración para la determinación de aminoácidos por espectrofotometría UV-VIS.

Resultados y Discusión

✓ Precisión

Este parámetro incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia. Para el primer caso la técnica se repitió sin alterar las condiciones, mientras que en el segundo la técnica se desarrolló por diferentes analistas y en diferentes días.

La Tabla C.7 (Anexo C), muestra los resultados estadísticos obtenidos al evaluar ambos parámetros. El coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad (1,44%) resultó ser menor que el establecido para este ensayo cuando es realizado a materias primas farmacéuticas (1,5%) lo que indica que la técnica posee buena repetibilidad. Por su parte en la precisión intermedia se obtuvo también un coeficiente de variación (2,10%) inferior al establecido (3%), además, en este parámetro se evaluaron otros parámetros estadísticos que garantizan la veracidad de los resultados y cuyos estadígrafos aparecen también reflejados en la misma tabla.

El análisis de varianza realizado muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos al obtenerse en la prueba Fischer una $F_{\text{cal}} < F_{\text{Crítica}}$. Esto es ratificado por el Test de Cochran's ($C_{\text{cal}}=0,57$) en el cual se obtuvo una $C_{\text{cal}} < C_{\text{Crítica}}$. Finalmente el Coeficiente de variación entre los grupos ($CV(\%) = 0,94$) resultó ser menor que el valor obtenido para el coeficiente de variación de Horwitz (4,52) ratificando con esto la veracidad del resto de las pruebas.

Los resultados obtenidos en ambos parámetros permiten asegurar que la técnica espectrofotométrica para la determinación de aminoácidos, en base asparagina, en el polvo de *Cucurbita moschata* Duch es “precisa”.

✓ Exactitud

Las concentraciones añadidas del patrón asparagina y las recuperaciones obtenidas se recogen en la Tabla C.8 (Anexo C). El porcentaje de recuperación promedio fue de $100,68 \pm 1,81\%$. El recobrado medio de los tres niveles de concentración es calculado y es realizado una prueba t-Student en la cual se obtuvo como resultados una $t_{\text{calc.}} < t_{\text{crit.}}$ corroborándose que el por ciento de recobro obtenido no es significativamente diferente de 100%.

Los resultados anteriores se ratificaron con la curva de recuperación, Figura 3.12, el valor de la pendiente se corresponde con la recuperación y posee coincidencia con el valor de recobrado promedio anteriormente calculado.

Estos valores demuestran una elevada exactitud en las determinaciones de aminoácidos, en base asparagina, con el procedimiento utilizado.

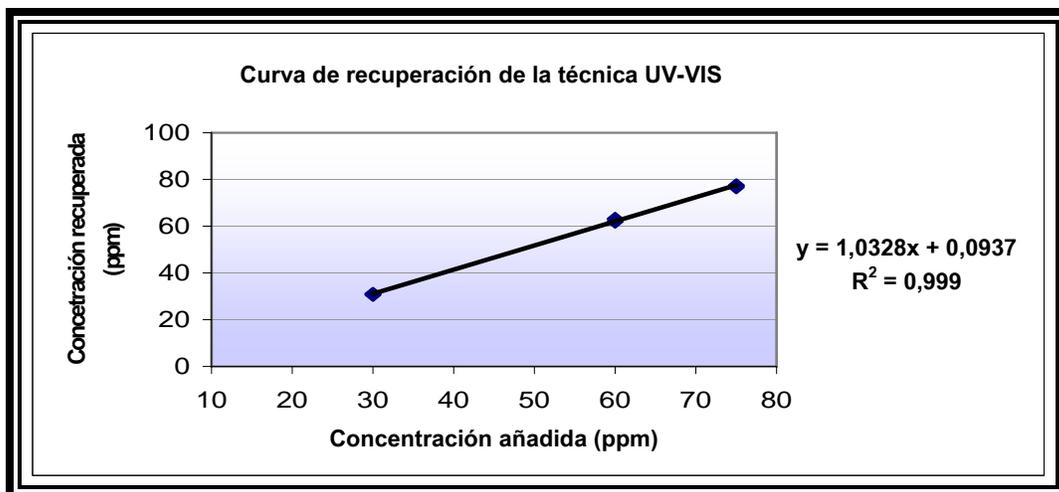


Figura 3.12. Curva de recuperación para el patrón asparagina en la técnica UV-VIS.

✓ Especificidad

La especificidad se evaluó a través de un estudio de interferencias, usando la Cromatografía en Capa Delgada (CCD) como técnica auxiliar. Se valoró el comportamiento en la absorción de los patrones de aminoácidos, detectados en la muestra, en la zona del espectro donde se realiza la determinación ([Figura 3.10](#)). De los 12 aminoácidos valorados por CCD con posibilidades de estar presentes en la muestra solo 5 presentan máximos de absorción en la zona de interés del espectro, el resto forma el complejo RP y por tanto presentan su máximo en el rango de 500-600nm, constituyendo, por tanto estos 5 aminoácidos los de mayor interés (Lisina, prolina, hidroxiprolina, Cucurbitina y asparagina). Como se observa en la [Tabla 3.4](#) todos presentan absorción en la zona evaluada (300-400nm) aunque solo hay coincidencia de la longitud de onda máxima para la asparagina y la Cucurbitina; la hidroxiprolina y la prolina poseen su $\lambda_{m\acute{a}x}$ a 350nm, mientras que la lisina posee una banda muy ancha entre 320 y 340 siendo difícil en este rango determinar el valor exacto de la $\lambda_{m\acute{a}x}$ de este aminoácido. Este hecho experimental demuestra la especificidad del método de cuantificación si se tiene en consideración que la técnica esta dirigida a la determinación la cantidad total de aminoácidos, que reaccionan de forma similar a la Cucurbitina con la ninhidrina, en base a uno de ellos, la asparagina.

✓ Sensibilidad. Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Los resultados del LD y LC se recogen también en la [Tabla C.9 \(Anexo C\)](#). Como límite de detección se obtuvo 3,5ppm y como Límite de Cuantificación 10,85ppm, valores que se encuentran por debajo del valor más bajo de concentración evaluado en la técnica.

Con los resultados obtenidos en los cinco parámetros de validación se puede afirmar que la técnica espectrofotométrica evaluada para la determinación total de aminoácidos, en base a asparagina, es fiable.

Resultados y Discusión

Una vez validada la técnica se aplicó en la determinación del porcentaje de aminoácidos en 10 muestras del polvo II, obteniéndose que el mismo posee un valor promedio de 0.78% de aminoácidos calculado en base a asparagina. La aplicación del método de Bowker permitió calcular el límite inferior de especificación para este ensayo el cual resultó ser de 0.69% de aminoácidos, estos resultados aparecen reflejados en la [Tabla C.10 \(Anexo C\)](#). El establecimiento de dicho límite se realizará aplicando la técnica en 10 lotes del producto, cuando sea obtenido a escala industrial.

3.2.4. Descripción y aplicación de los ensayos de control de calidad del polvo de *Cucurbita moschata* Duch. Comparación con el polvo que se comercializa en Cuba

Una vez seleccionados los ensayos cualitativos que formarían parte de la identificación de los componentes del polvo, se establecieron los límites de especificación de los ensayos específicos y se validó la técnica espectrofotométrica, como ensayo cuantitativo, se procedió a redactar la monografía de control de la calidad el polvo obtenido a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, la cual se estructuró siguiendo la metodología descrita por las farmacopeas vigentes. Dicha monografía aparece en el [Anexo D](#). La monografía propuesta se aplicó al control de la calidad de tres lotes del polvo que se comercializa actualmente en Cuba, por los laboratorios de fitofármacos, obtenido por el método I (polvo I) y tres lotes del polvo evaluado, obtenido por el método II (Polvo II), los resultados promedios aparecen descritos en la [Tabla 3.5](#) (Datos tomados de la [Tabla E.1 \(Anexo E\)](#)).

Tabla 3.5. Resultados promedios obtenidos en el Control de calidad del polvo aplicando los ensayos de control de calidad evaluados en el trabajo.

MUESTRA	Ensayos de identificación				Ensayos específicos			Ensayo cuantitativo (% de aa)
	Macro y Micro	Reacción Ninhidrina	Reacción Folling	CCD	Pérdida por desecación (%)	Cenizas totales (%)	Cenizas insolubles (%)	
Polvo I	Cumple	++++	++++	5 manchas	6,26±0,01	5,45±0,2	2,39±0,2	0,41 ± 0,0007
Polvo II	Cumple	++++	++++	5 manchas	6,33±0,01	5,58±0,1	2,66±0,2	0,79 ± 0,0200

Los resultados muestran de forma general una gran similitud en los ensayos de identificación, ambos polvos responden positivamente a estos ensayos, sin embargo muestran algunas diferencias en los ensayos cuantitativos realizados. Con vistas a precisar estas diferencias se realizó una comparación estadística usando el estadígrafo t de Student del paquete *Statgraphics, versión 4.1, 1999* y los resultados aparecen descritos en la [Tabla E.1 \(Anexo E\)](#). Los valores de probabilidad obtenidos en los ensayos específicos, cenizas totales, pérdida por desecación y las cenizas insolubles muestran que no existen diferencias significativas entre los polvos, resultados que se consideran lógicos si se tiene en cuenta que la

Resultados y Discusión

presencia o no de aceite presente en dichos polvos no debe producir variaciones en la humedad ni en el contenido de impurezas inorgánicas de los mismos. Sin embargo, el contenido de aminoácidos muestran la existencia de diferencias significativas entre los dos polvos, este comportamiento está relacionado con la variación en la composición de ambos polvos dado fundamentalmente por el contenido de aceite presente en el polvo I. El desgrase realizado como parte de la obtención del polvo II permite la eliminación de sustancias de naturaleza apolar y por consiguiente se logra elevar la concentración de los componentes solubles en solventes polares, entre los cuales están los aminoácidos.

Como se observa en la tabla el contenido de aminoácido total del polvo II es mucho mayor, con respecto al polvo I, aspecto muy importante si se tiene en cuenta que estos metabolitos son los responsables de la acción antihelmíntica y más aun si se considera que esta determinación está dirigida, al grupo de aminoácidos que como la Cucurbitina no forman el complejo RP.

3.3. Estudios analíticos para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina en los estudios de estabilidad

Teniendo en cuenta, que la Cucurbitina, metabolito responsable de la acción antihelmíntica, no se comercializa fue necesario realizar su aislamiento y evaluación previos a su utilización como patrón analítico, para lo cual se aplicó la metodología descrita por *Renimel I, 1998, Patente WO 92/15563*. Como segundo paso se validó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina en el polvo, con el objetivo utilizar esta técnica en los estudios de estabilidad del mismo.

3.3.1. Aislamiento y evaluación de la Cucurbitina para su uso como patrón analítico en los estudios de estabilidad

Aislamiento

El aislamiento de la Cucurbitina incluyó un proceso extractivo en medio ácido, teniendo en cuenta las características básicas de este aminoácido y un posterior tratamiento con resina intercambiadora Amberlite IR-120. El producto obtenido se purificó a través de una metodología descrita en la mismo trabajo (Patente). El rendimiento en peso obtenido, después de la purificación del producto, resultó ser de 0,38% de Cucurbitina, siendo este valor la media de 10 determinaciones.

Evaluación

En la evaluación de la cucurbitina aislada se obtuvieron los siguientes resultados:

- ✓ **Punto de Descomposición.** Se obtuvo un punto de descomposición de 286,5°C. este valor se corresponde con lo reportado por *Duez P, 1988* y *Schenkel F, 1992*, y que se ratificó más tarde por *Renimel I, 1998*.

Resultados y Discusión

- ✓ **Cromatográfica en Capa Delgada (CCD):** Se evidenció una sola mancha, color café, con un valor de $R_f = 0,23$, utilizando como Soporte la Silicagel GF, como Fase Móvil Metanol: Cloroformo: Amoniacó 25% y Ácido Acético (80:10:8.5:1.5) y como revelador una solución de ninhidrina al 0,5%. Estos resultados coinciden con los reportados por *Duez P, 1988* y *Schenkel F, 1992*, en cuyos trabajos se determina la Cucurbitina obtenida por síntesis química con una posterior caracterización espectroscópica.
- ✓ **Espectro Ultravioleta:** Se realizó en una mezcla Metanol: Agua (1:1), [Figura 3.13](#), reporta un máximo de absorción aproximadamente a 200nm, lo cual evidencia la baja absorción que caracteriza a estos compuestos y justifica la necesidad de su previa derivatización para usar esta técnica en su determinación cuantitativa.

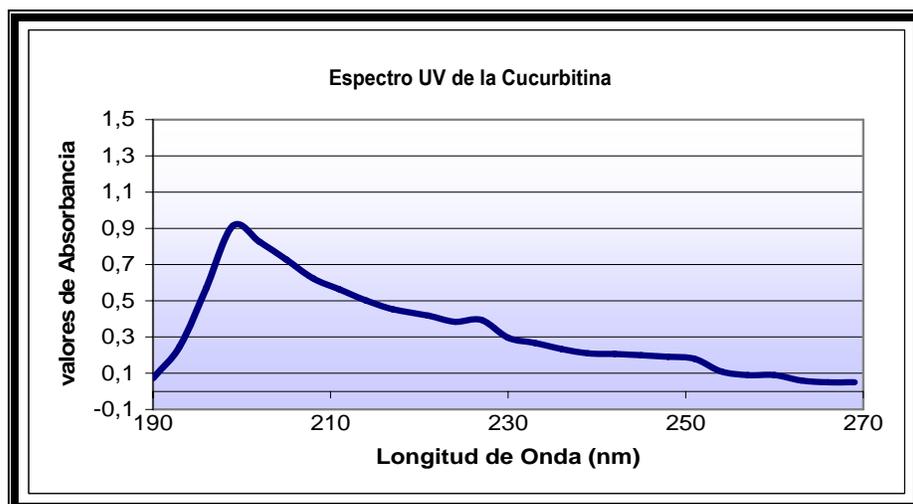


Figura 3.13. Espectro UV de la Cucurbitina en una mezcla Metanol: Agua (1:1).

- ✓ **Espectro IR,** desarrollado en tabletas de KBr ([Figura 3.14](#)), reporta las siguientes bandas: IR (KBR) $\nu_{(N-H)}$ 3285-3060, $\nu_{(O-H)}$ 3200-2500, $\nu_{(C=O)}$ 1725-1710, 1388, $\nu_{(C-O)}$ 1400, $\delta_{(N-H)}$ 1602, $\nu_{(C-N)}$ 1258, $\nu_{(C-N)}$ 1087 cm^{-1} , las cuales se corresponden a los grupos funcionales presentes en la Cucurbitina.

Los resultados obtenidos en la caracterización de la cucurbitina ofrecen resultados alentadores, sin embargo no pueden considerarse definitivos, requiriéndose para ello de la complementación de los espectros RMN y Masa. Por tal motivo, el producto obtenido será considerado como patrón de trabajo hasta tanto se complete su caracterización.

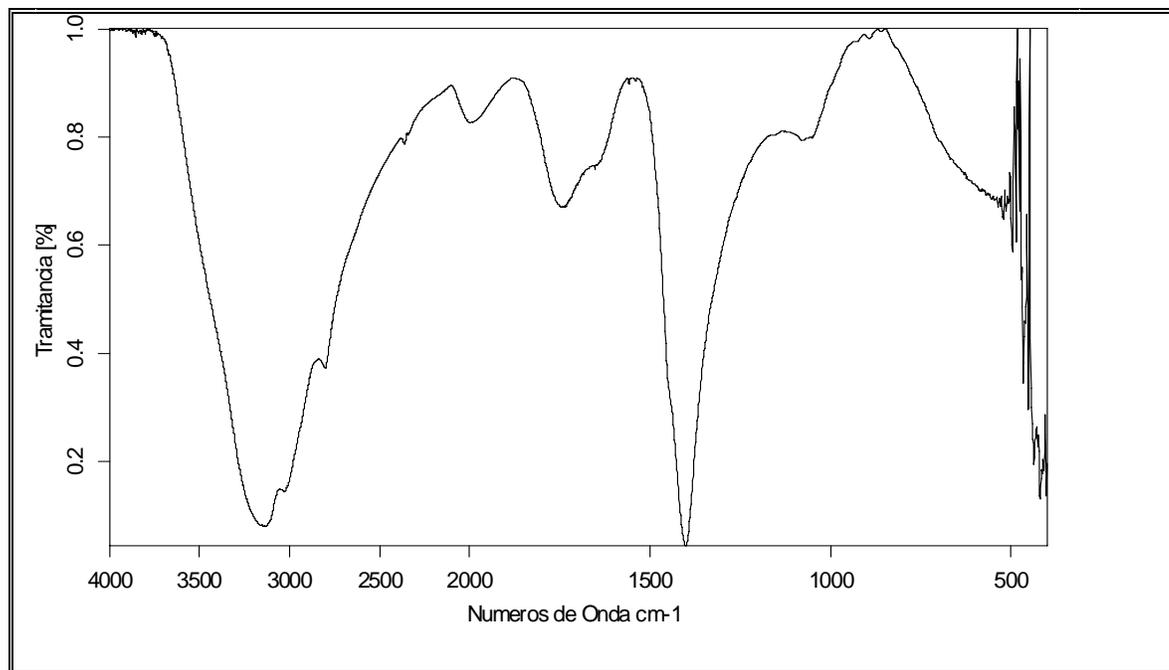


Figura 3.14. Espectro IR de la Cucurbitina en KBr.

- ✓ **Determinación de la pureza de la Cucurbitina:** Ante la carencia de un patrón analítico fue necesario determinar la pureza del producto aislado usando una técnica tradicional volumétrica. Para su selección se tuvo en cuenta la presencia en la estructura de la Cucurbitina de los grupos básicos (dos grupos amino) que brindan al compuesto características básicas y por ende la posibilidad de realizar la volumetría de neutralización. La técnica seleccionada se corresponde con la técnica cuantitativa descrita en las farmacopeas oficiales para aminoácidos con características similares a la Cucurbitina.

La [Figura 3.15](#) muestra el comportamiento lineal de la técnica (con un valor de $r=0,9945$), lo cual es corroborado a través de los resultados obtenidos en el procesamiento estadístico realizado, cuyos datos aparecen en la [Tabla F.1 \(Anexo F\)](#) Por su parte también se demostró la precisión de la técnica a través de los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia aportando resultados satisfactorios que aparecen en la [Tabla F.2 \(Anexo F\)](#). Es importante señalar que las técnicas volumétricas muestran de forma general baja especificidad, por lo que en este caso la necesidad de usarla obliga a combinarla con técnicas cromatográficas como es el caso de la Cromatografía en Capa Delgada que mostrara la no existencia de manchas adicionales como muestra de pureza considerando que el revelador empleado es capaz de reaccionar con un gran número de compuestos afines.

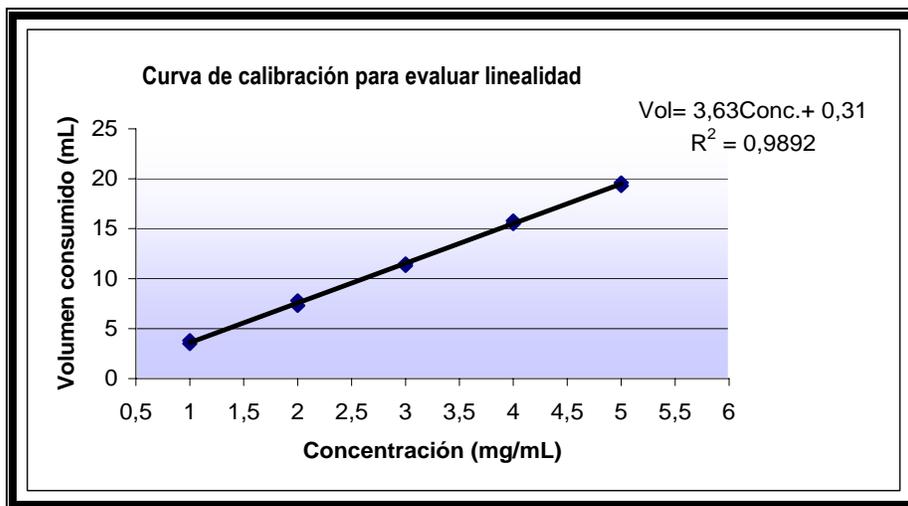


Figura 3.15. Curva de calibración para evaluar la linealidad en la Técnica Volumétrica, utilizada para calcular la pureza de la Cucurbitina

Una vez comprobado que la técnica respondía adecuadamente se aplicó la misma para determinar la pureza de la Cucurbitina aislada, se realizaron cinco réplicas y se obtuvo valor promedio de pureza del 98.26%. Teniendo en cuenta la metodología engorrosa usada para el aislamiento, así como las bajas concentraciones en que se encuentra el producto en el material vegetal se considera adecuado el valor obtenido y se recomienda el uso del producto como patrón de análisis, fundamentalmente en los estudios de estabilidad del polvo.

3.3.2. Validación de la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la determinación cuantitativa de la Cucurbitina

Para la definición de las condiciones cromatográficas para la técnica de HPLC se tomaron en cuenta los estudios publicados en múltiples trabajos científicos, tales como, *Calull R. y col., 1990; Senden M. y col., 1992; González MJ. Y col., 1997*, sobre la determinación de aminoácidos presentes en productos vegetales, siendo de gran importancia los trabajos realizados por *Jones D, 2002* y *Moulin M, 2002* quienes sugieren el uso de la fase reversa y la reacción de ninhidrina como agente derivatizante en la determinación de aminoácidos libres en productos vegetales.

De los agentes derivatizantes más utilizado en la determinación de aminoácidos se escogió la ninhidrina por dos razones fundamentales; por una parte es una reacción muy sencilla, posible de desarrollar bajo condiciones experimentales normales, con baja toxicidad, lo cual es ventajoso si se compara con la derivatización usando agentes tales como el Fenilisotiocianato (PIT), el o-ftaldehído o los mercapto-derivados que requieren de condiciones especiales para el desarrollo de la reacción.

Resultados y Discusión

Por otra parte, se tuvo en cuenta que esta reacción a pesar de ofrecer evidencia experimental en la mayoría de los aminoácidos posee particularidades en el cromóforo obtenido, lo que puede ser observado en la [Figura G.1 \(Anexo G\)](#), mostrando diferencias en la coloración y por ende en la absorción en un pequeño grupo de aminoácidos entre los cuales se encuentran los aminoácidos pirrolidínicos que incluyen a la Cucurbitina.

Como fase móvil se estudiaron combinaciones de Acetonitrilo: agua hasta determinar que los mejores resultados eran obtenidos con la combinación 30:70.

Teniendo en cuenta que el desarrollo de la técnica incluye el uso de la ninhidrina y que en el desarrollo de una reacción colorimétrica el reactivo responsable de la coloración debe estar en exceso, lo que implica mantenerlo en la muestra a procesar, fue necesario conocer la respuesta que ofrecía la técnica para la ninhidrina bajo las condiciones seleccionadas. La [Figura 3.16](#) muestra el cromatograma obtenido para la ninhidrina y para el patrón de Cucurbitina.

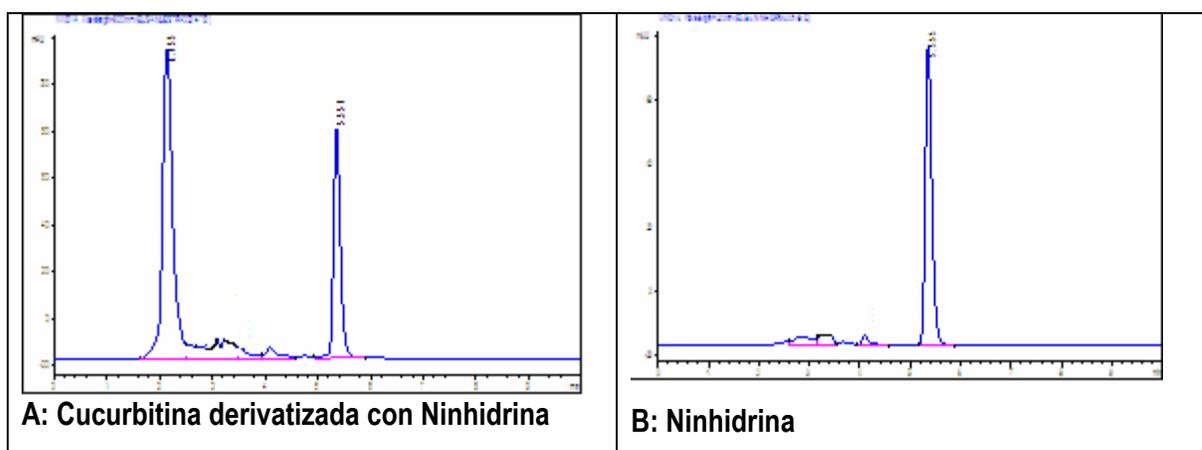


Figura 3.16. Cromatogramas obtenidos para el patrón Cucurbitina (A) y la ninhidrina (B); utilizando como Fase estacionaria: Gel de sílice octadecilsililado (C₁₈) para cromatografía (5 μm), como Fase móvil: Acetonitrilo, Agua (30: 70 V/V) y una detección espectrofotométrica a 320 nm.

Como se observa el patrón de Cucurbitina muestra dos picos con tiempos de retención (t_r)= 2.20 y t_r = 5,34, si se observa el cromatograma de la ninhidrina se puede deducir que el segundo pico corresponde a la ninhidrina, cuyo patrón posee un tiempo de retención de 5,35 minutos. La buena resolución del cromatograma con una separación adecuada de ambos picos posibilita asegurar que las condiciones sugeridas pueden ser usadas para someter la técnica al proceso de validación que aparece descrito a continuación.

Resultados y Discusión

Linealidad

La [Figura 3.17](#) muestra la curva de calibración obtenida al evaluar el parámetro linealidad en la técnica cromatográfica usada para la determinación de Cucurbitina en el polvo. Los criterios estadísticos utilizados para evaluar el parámetro aparecen en la [Tabla H.1 \(Anexo H\)](#). Si se comparan los valores obtenidos en cada parámetro con los criterios establecidos por las *normas ICH, 1996*, se puede afirmar que en todos los casos se encuentran dentro del rango especificado. La ecuación de la recta obtenida **Abs= 7,817Conc – 31,5** con un coeficiente de correlación 0,998 (superior a 0,99) y un coeficiente de variación de los factores respuesta de 5,02%. La fiabilidad de la ecuación se evaluó, además, a través del error típico cuyo valor es muy inferior a la desviación Standard de la variable Y, a través de la desviación standard de la pendiente que es menor que es de 0,37 y de los límites del término independiente que incluyen al cero. Finalmente el análisis de varianza de la regresión, realizado para evaluar el parámetro aporta un valor de F estadísticamente significativo al obtenerse una $F_{\text{calc.}} > F_{\text{crit.}}$, este resultado pudiera invalidar el método si no se hubiera obtenido un Coeficiente de Calidad 9,34 E-07 (inferior a 2,5%) lo que nos indica, junto al resto de los parámetros evaluados que la técnica cumple con los requisitos establecidos para el ensayo de linealidad en el rango de concentraciones estudiado; es decir, el método es “lineal”.

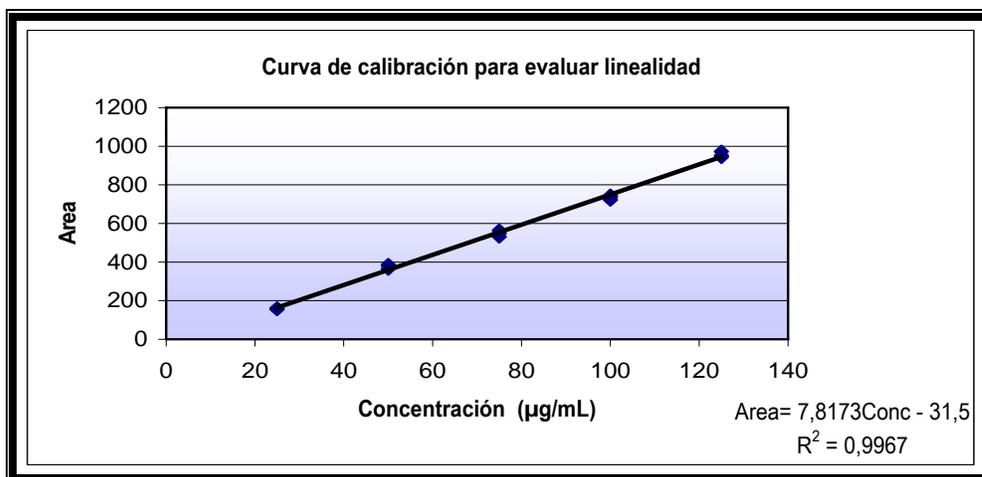


Figura 3.17. Curva de calibración para la determinación de Cucurbitina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Precisión: Este parámetro incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia. Para el primer caso la técnica se repitió sin alterar las condiciones, mientras que en el segundo la técnica se desarrolló por diferentes analistas y en diferentes días.

Resultados y Discusión

La Tabla H.2 (Anexo H) muestra los resultados estadísticos obtenidos al evaluar ambos parámetros. El coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad resultó ser (0,84%), menor que el establecido para este ensayo cuando es realizado a materias primas farmacéuticas (1,5%) lo que indica que la técnica posee buena repetibilidad. Por su parte en la precisión intermedia se obtuvo también un coeficiente de variación (CV=0,91), inferior al establecido (3%). Además en este parámetro se evaluaron otros parámetros estadísticos que garantizan la veracidad de los resultados y cuyos estadígrafos aparecen también reflejados en la misma tabla. En el Test de Cochran se obtuvo una $C = 0,33$, siendo la $C_{cal} < C_{Crítica}$, mientras que los resultados obtenidos en el análisis de varianza corroboran lo anterior al mostrar la prueba de Fischer la no existencia de diferencias significativas para los valores obtenidos con una $F_{cal} < F_{Crítica}$. Finalmente se calculó el coeficiente de variación de Horwitz (1,52) cuyo valor permite asegurar que el método es preciso pues resultó ser superior al coeficiente de variación entre los días. Los resultados obtenidos en ambos parámetros permiten asegurar que la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación Cucurbitina en el polvo de *Cucurbita moschata* Duch es “precisa”.

Especificidad

La especificidad se evaluó a través de un estudio de interferencias, usando los resultados obtenidos en la Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y en la Espectrofotometría UV-VIS como técnicas auxiliares, teniendo en consideración que la HPLC usa la absorción como detección se valoró el comportamiento en la absorción de los patrones de aminoácidos, detectados en la muestra, en la zona del espectro donde se realiza la determinación (320nm). De los 12 aminoácidos valorados por CCD con posibilidades de estar presentes en la muestra solo 5 presentan máximos de absorción en la zona de interés del espectro, el resto forma el complejo RP y por tanto presentan su máximo en el rango de 500-600nm. Estos aminoácidos son prolina, hidroxiprolina, Cucurbitina, lisina y asparagina. La Figura 3.18 presenta los cromatogramas obtenidos para cada patrón de estos aminoácidos, señalando los tiempos de retención de los principales picos. Se visualiza en todos los cromatogramas picos bien definidos pero a diferentes tiempos de retención.

Resultados y Discusión

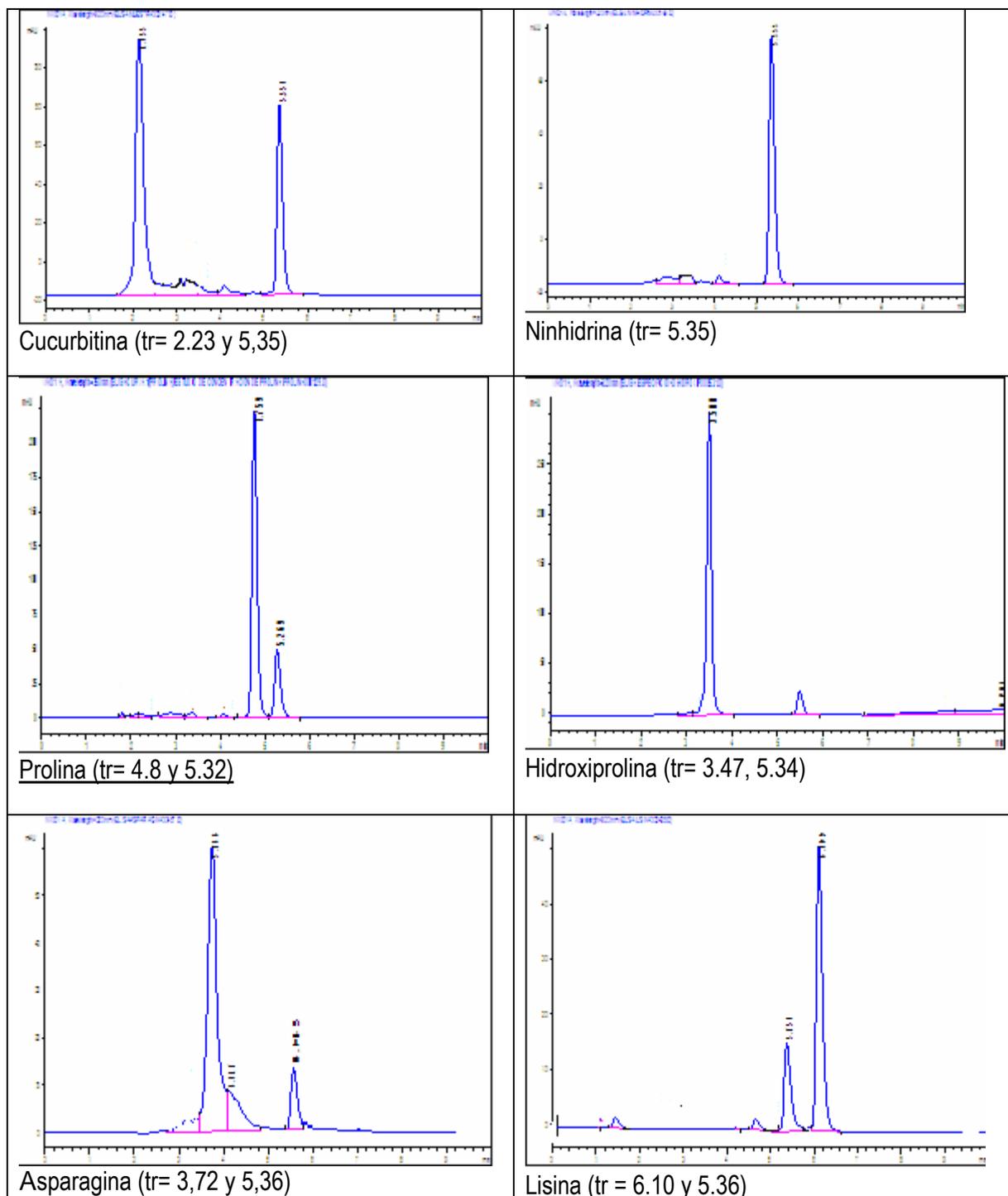


Figura 3.18. Cromatogramas obtenidos para la Cucurbitina y aminoácidos que pueden constituir interferencias por HPLC, utilizando como Fase estacionaria: Gel de sílice octadecilsilado (C₁₈) para cromatografía (5 μm), como Fase móvil: Acetonitrilo, Agua (30: 70 V/V) y una detección espectrofotométrica a 320 nm.

Si se observa la [Figura 3.19](#), que representa el cromatograma obtenido para la muestra problema y se comparan los picos obtenidos en el mismo, con los cromatogramas de los patrones se puede afirmar la

Resultados y Discusión

aparición del pico correspondiente a la Cucurbitina al menor tiempo de retención y el pico de la ninhidrina que aparece a 5,35 min., el resto de los picos, aunque no hay seguridad total en su asignación, se puede inferir que los picos que aparecen entre los tres y los cuatro minutos estén relacionados con la presencia de asparagina o lisina. Es importante destacar que las concentraciones de estos metabolitos en el polvo son muy bajas y por tanto la aparición o no de ellos en el cromatograma de la muestra depende de que el tratamiento previo permita extraerlos en una concentración adecuada para su determinación, con las condiciones cromatográficas evaluadas. Estas valoraciones permiten afirmar que, bajo estas condiciones, la técnica posibilita determinar la Cucurbitina en presencia del resto de los aminoácidos presentes en el polvo. Este hecho experimental demuestra la especificidad del método.

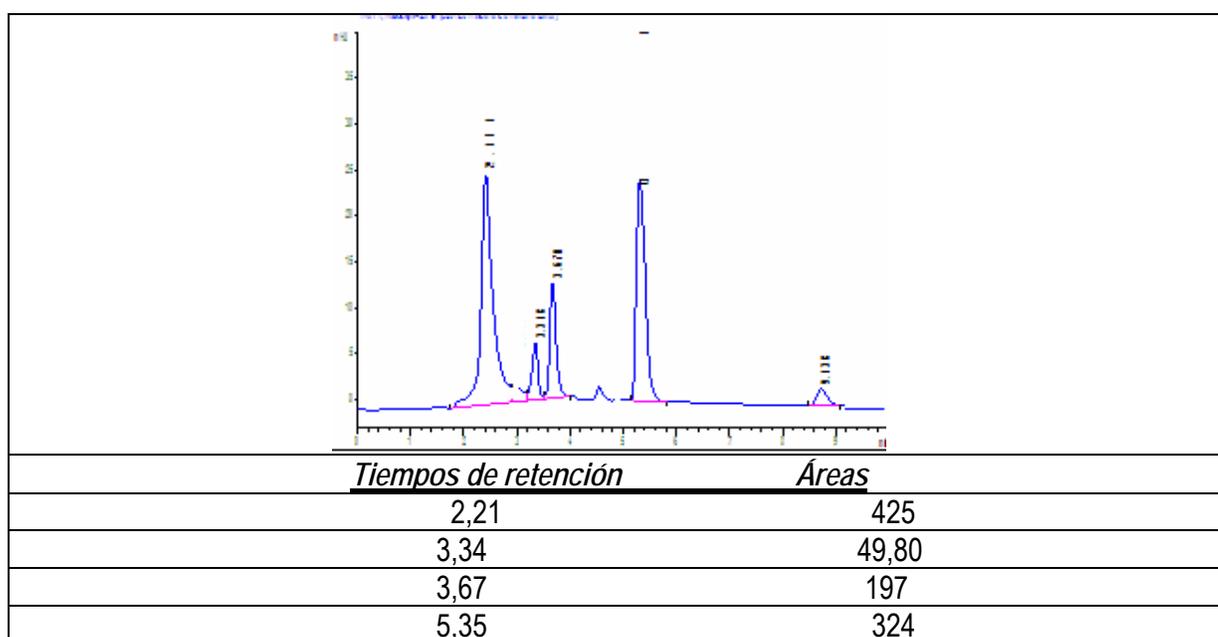


Figura 3.19. A: Cromatogramas obtenidos para la muestra, utilizando la técnica HPLC (Fase estacionaria: Gel de sílice octadecilsililado (C₁₈) para cromatografía (5 µm), Fase móvil: Acetonitrilo, Agua (30: 70 V/V) y una detección espectrofotométrica a 320 nm).

Sensibilidad. Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).

Los resultados del LD y LC se recogen en la Tabla H.3 (Anexo H). Como límite de detección se obtuvo 4,98ppm y como Límite de Cuantificación 15.08ppm, valores que se encuentran por debajo del valor más bajo de concentración evaluado en la técnica.

Después de comprobar que la técnica cromatográfica evaluada para determinar el contenido de Cucurbitina en el polvo, cumple con los parámetros Linealidad, Precisión, Especificidad y Sensibilidad con resultados muy satisfactorios en todos los casos, se decidió no evaluar el parámetro **exactitud** teniendo en cuenta que las *normas ICH, 1996* sugieren que se puede inferir que la técnica es exacta cuando han sido evaluados los

Resultados y Discusión

cuatro parámetros restantes, con resultados satisfactorios. Todos los resultados anteriores avalan la técnica para ser usada con el objetivo propuesto.

3.4. Ensayos físico-químicos realizados para los estudios de preformulación del polvo obtenido a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, por el método II, para su uso como ingrediente activo en formas farmacéuticas sólidas

El polvo de *Cucurbita moschata* Duch, obtenido por el método II, constituye un nuevo ingrediente activo por lo que debe ser caracterizado desde el punto de vista físico-químico y tecnológico, de forma tal que la información obtenida, sirva de base para el desarrollo de una formulación, administrada por vía oral, estable y con características adecuadas.

3.4.1. Medición de la distribución de tamaño de partícula

La Figura 3.20 (Datos tomados de la [Tabla 1.1 \(Anexo 1\)](#)) muestra los resultados obtenidos en la tamización realizada para determinar la distribución del tamaño de partícula en el polvo, los valores son el promedio de 10 determinaciones. Como se observa hay una tendencia a la distribución normal, lo que se ratificó estadísticamente con el Test de Kolmogorov-Smirnov, del paquete estadístico SPSS, cuyo estadígrafo K-S Z ($Z= 1,319$) y la probabilidad asociada ($P=0,062$) aceptan la hipótesis nula es decir se afirma que la distribución es normal, al cumplirse que la $P>0,05$. Estos resultados se corresponden con las exigencias para ser utilizado este producto como materia prima en una forma farmacéutica sólida. Al realizar el cálculo del diámetro medio de las partículas se obtuvo un valor de 0,212 mm.

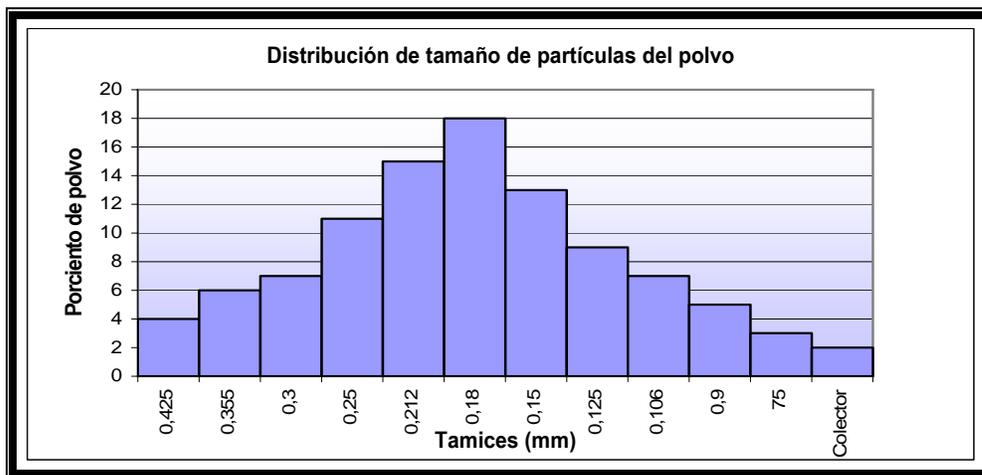


Figura 3.20. Distribución del tamaño de partícula en el polvo.

3.4.2. Determinación de la humedad residual del polvo

Los resultados obtenidos para la humedad residual del polvo aparecen en la [Tabla 3.6](#), el promedio, $6,33 \pm 0,101$, se encuentra dentro del límite máximo calculado en el presente trabajo para el parámetro pérdida por

Resultados y Discusión

deseccación (no mayor que 7). Si se compara el resultado obtenido con valores de pérdida por desecación reportados por la *Farmacopea Europea, 2005*, para polvos, obtenidos de diferentes partes de plantas medicinales (Tabla 1.2 (Anexo I)) se puede afirmar que el valor obtenido para el polvo en estudio se encuentra en un rango aceptable para este parámetro. Sin embargo si se tiene en cuenta que el polvo será utilizado como ingrediente activo en una forma farmacéutica sólida y dentro de las exigencias que se deben cumplir para ello esta el tener valores bajos de humedad residual es importante considerar este aspecto dentro de los que deben ser resueltos durante el proceso de formulación.

Tabla 3.6: Determinaciones de humedad residual del polvo

%Humedad										X	SD	CV
6,55	6,35	6,36	6,45	6,22	6,28	6,34	6,25	6,26	6,27	6,33	0,10	1,61
X: Media de 10 determinaciones; SD: Desviación Standard; CV: Coeficiente de variación												

3.4.3. Estudios de Higroscopicidad

Uno de los aspectos que condiciona, en buena medida, el manejo de los productos utilizados en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas, es el referido a sus interacciones con la humedad ambiental, teniendo en cuenta lo anterior y los valores de humedad residual propios de los polvos obtenidos a partir de plantas medicinales, los estudios de higroscopicidad se realizaron aplicando las dos metodologías sugeridos por *Steele G, 2004*. La primera metodología es reportada por la Guía Técnica de la *Farmacopea Europea, 1999*, usa el Método estático (25°C y 80% HR por 24 horas) y clasifica la higroscopicidad en Ligeramente higroscópico, higroscópico, muy higroscópico y deliquescente; mientras que la segunda metodología es la reportada por *Callagan JC, 1982*, que también clasifica el grado de higroscopicidad en cuatro clases pero cambia las condiciones de humedad relativa para cada clase. (Ambas clasificaciones aparecen en el epígrafe 2.6.2).

Los resultados obtenidos por el método estático aparecen en la Tabla 3.7, como se observa, al colocar el polvo a las condiciones establecidas para esta metodología, 80% de humedad relativa y temperatura 25 °C, hubo un incremento de masa menor del 2% lo que clasifica el polvo como ligeramente higroscópico.

Tabla 3.7. Resultados promedios obtenidos en el estudio de higroscopicidad por el método estático

Peso muestra	24 horas	Incremento en peso	Porcentaje	Media	Desviación Standard
1,3280	1,3507	0,0227	1,70	1,60	0,11
1,4659	1,4898	0,0239	1,63		
1,4523	1,4739	0,0216	1,48		

Resultados y Discusión

Por su parte el análisis de la higroscopicidad realizado por el método de Callagan JC, 1982, cuyos resultados aparecen en el epígrafe 2.6.2, y se reflejan en la [Figura 3.21](#) ratifica el resultado obtenido por el método estático; el aumento del contenido en la humedad de equilibrio (CHE) por debajo de 90 y de 80 % de humedad relativa indica que la sustancia muestra higroscopicidad, siendo esta moderada al obtenerse valores de este parámetro menores del 5% cuando la muestra se almacenó, por una semana a Humedades relativas por debajo de 60%, además no se observó incremento del CHE en el rango comprendido entre 40 y 50%.

Por lo tanto queda demostrado que el polvo evaluado se presenta como una sustancia ligeramente higroscópica, aspecto que debe tenerse presente en su almacenamiento. El estudio permite sugerir que el polvo debe ser almacenado por debajo del 70% de humedad relativa, lo que podría lograrse en una habitación climatizada o ambiente controlado, además, unido a la humedad residual presente en el mismo, la ligera higroscopicidad del polvo debe tenerse presente para la selección de sustancias auxiliares en la formulación, se sugiere el empleo en las formulaciones de agentes desecantes, mientras que en la selección del envase se sugiere frascos con cierre hermético con pocas posibilidades de intercambio con la atmósfera (vidrio, plástico de alta densidad, etc.) o el empleo en dichos frascos de desecantes, como sílica gel, *por ejemplo* en el fondo o en la tapa.

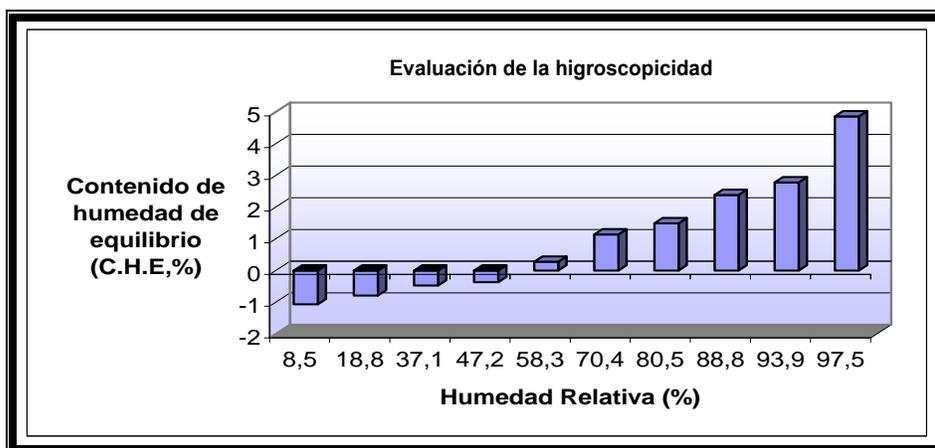


Figura 3.21. Evaluación de la Higroscopicidad, según el método de *Callagan*.

3.4.4. Determinación de la Fluidéz del polvo

La evaluación de las propiedades de flujo del polvo ha sido objeto de una atención considerable en el presente trabajo, teniendo en cuenta que los ingredientes activos derivados de las plantas medicinales muestran, frecuentemente, pobre fluidéz, *Kleinebudde P. y col., 2004*. Para la evaluación de estas

Resultados y Discusión

propiedades es posible emplear diferentes procedimientos que se caracterizan por suministrar, cada uno de ellos, información parcial acerca del flujo; es decir, con la aplicación de un único método no es posible definir globalmente el comportamiento reológico de un determinado producto, *Gómez Amoza JL., 1997*.

Para medir la fluidez del polvo obtenido se acudió al empleo de tres aproximaciones que, por presentar distinto fundamento, deben aportar información complementaria al respecto. Es importante aclarar que las medidas del flujo, empleando la técnica a través de un orificio, que permite determinar la velocidad de flujo la velocidad de flujo y otros parámetros angulares, no puede ser aplicado en este estudio pues esta técnica solo es recomendable cuando el polvo fluye libremente, característica que no posee el polvo evaluado, Amidon G, 1999.

🔪 Mediciones realizadas en el equipo Hosokawa: Los parámetros medidos en el Hosokawa, Ángulo de Reposo y Espátula y la Compresibilidad, para el polvo aparecen en la [Tabla 3.8](#), al analizar los valores obtenidos, usando la Tabla de Carr, Ángel K., 2003, se pueden realizar las siguientes valoraciones: El ángulo de reposo da una valoración cualitativa de la cohesividad interna y los efectos de fricción, el valor obtenido, superior a 40°, muestra una pobre fluidez; por su parte el ángulo de espátula reitera los criterios de que existe una elevada fricción interna en el polvo y al igual que el ángulo de reposo su valor es indicativo de pobre fluidez. La compresibilidad obtenida entre un 40 y 50% presenta al polvo como un producto con dificultades para correr en la tolva, es decir con una fluidez muy pobre, *Nagel K, 2003*.

Tabla 3.8. Resultados de las propiedades de flujo determinado en el equipo Hosokawa PT-E correspondientes al polvo.

Parámetro	Determinaciones			X±SD	Grado de Fluidez
Ángulo de Reposo (°)	50.00	49.00	49,50	49,50 ±0,50	Muy Malo
Ángulo de Espátula (°)	62,60	60,15	61,37	61,37 ±1,22	
Compresibilidad (%)	37,78	38,59	40.00	38,79 ±1,12	
X: Media de 3 determinaciones; SD: Desviación Standard					

🔪 Determinación del Índice de Compresibilidad y de Hausner: Para el cálculo de estos índices fue necesario determinar previamente la Densidad Aparente (de vertido y de asentamiento) y la Densidad Real. En la [Tabla 3.9](#) se describen los resultados obtenidos al realizar las determinaciones de Densidad Aparente y Real, se destacan los valores muy superiores de densidad real, aspecto, que da indicio de una alta capacidad de empaquetamiento por parte del polvo debiéndose esperar que el mismo se comporte como un sólido que no fluya adecuadamente.

Resultados y Discusión

Tabla 3.9. Medidas de Densidad aparente (de vertido y de asentamiento) y de Densidad real del polvo.

Valores de Densidad Aparente de Vertido					X	SD	CV
0,38	0,39	0,38	0,40	0,39	0,39	0,007	1,71
Valores de Densidad Aparente de Asentamiento					X	SD	CV
0,5555	0,5434	0,5494	0,5376	0,5555	0,545	0,007	1,25
Valores Medios de Densidad Real					X	SD	CV
1,3976	1,4502	1,5777	1,5805	1,3976	1,4502	1,88	1,88
Índice de Compresibilidad de Carr = 35%					Índice de Hausner (IH) = 1,38		
X: Media de 10 determinaciones; SD: Desviación Standard; CV: Coeficiente de variación							

Con los datos procedentes de las densidades aparente, de vertido y asentamiento, se determinó el Índice de Compresibilidad de Carr, indicando el resultado obtenido de que el polvo posee deficientes propiedades de flujo, al observar la tabla de clasificación de las propiedades de flujo en función de los valores de compresibilidad, propuesta por Carr R, 1965. Por su parte el Índice de Hausner aportó valores superiores al establecido para que el polvo tuviera fluidez, lo que reafirma el resultado anterior.

Medidas de Fuerza de Cizalla

Los resultados obtenidos en los dos procedimientos descritos son ratificados por el valor de factor de flujo, - **3,97** - (Tabla 3.10) estimado a partir de medidas de cizallamiento, y que al ser menor que cuatro demuestra que el polvo posee pobre fluidez y no es propicio para ser utilizado en la formulación de una forma farmacéutica sólida, sin antes haber resuelto esta dificultad.

Tabla 3.10. Resultados obtenidos en los ensayos en célula de cizalla correspondientes al polvo.

Tensión Normal Máxima (g/cm ²)	Cohesión (g/cm ²)	Fc (g/cm ²)	σ_i (g/cm ²)	Factor de Flujo
20	4,99	18,73	54,53	3,97
	4,57	17,69	56,22	
35	6,60	26,72	102,59	
	6,65	26,93	102,56	
50	10,34	40,89	143,07	
	9,78	39,64	147,36	

En resumen, en este estudio se debe afrontar el desarrollo de formas farmacéuticas sólidas de un ingrediente activo con evidentes deficiencias en sus propiedades de flujo, lo que constituye el principal problema a solucionar durante el proceso de formulación, coincidiendo así con el comportamiento general que muestran los ingredientes activos de origen natural. La literatura consultada sugiere varias alternativas para su

Resultados y Discusión

solución, entre las cuales se destaca la granulación húmeda, con solventes no acuosos (Díaz I, 1996); el uso de excipientes (Lubricantes) para mejorar las propiedades de flujo del producto, tales como Dióxido Sílice Coloidal y el Estearato de Magnesio (De Souza TP y col., 2001) y más recientemente se han realizado estudios para el uso de la granulación seca que muestran ventajas significativas al dar la posibilidad de obtener formulaciones con altas dosis de estos ingredientes activos (*Rocksloh K. y col., 1999; Von Eggelkraut-Gottanka SG. Y col., 2002 y Soares LA. y col., 2005*). Estas constituyen variantes que pudieran ser valoradas en el polvo.

3.4.5. Estudios de compatibilidad

Con el fin de comprobar las interacciones entre el polvo y las posibles sustancias auxiliares que pudieran ser utilizadas en la formulación del mismo se realizaron estudios a través de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Para la selección de dichas sustancias auxiliares se tuvieron tres consideraciones generales: **(A)** Las sustancias auxiliares más utilizadas en la formulación de formas farmacéuticas sólidas con ingredientes activos de origen vegetal, **(B)** Los problemas tecnológicos que presenta el polvo (higroscopicidad, mala fluidez y la necesidad de incorporar grandes dosis de ingrediente activo) y **(C)** La granulación constituye la técnica más usada para mejorar estos problemas tecnológicos. De esta forma se seleccionó el eudragit L, la celulosa microcristalina (AVICEL), la carboximetilcelulosa sódica y la Lactosa, como los excipientes más utilizados para facilitar la incorporación de grandes dosis de ingrediente activo y que pueden propiciar también mejoras en la higroscopicidad, mientras que el estearato de magnesio y el talco, como los deslizantes más utilizados para mejorar el flujo en los ingredientes activos obtenidos de plantas medicinales (*Díaz L. y col., 1997; Palma S. y col., 1999; Palma S. y col. 2002; De Souza T. y col., 2000; De Souza T. y col., 2001 y Soares LA, 2005*).

La [Figura 3.22](#) muestra los termogramas correspondientes a las sustancias auxiliares seleccionadas, y que la [Figura 3.23](#) muestra los termogramas del polvo y de las mezclas físicas creadas entre el polvo y dichas sustancias. En todos los casos, el intervalo de temperatura analizado fue de 0–250 °C. Teniendo en cuenta que el polvo es una mezcla de compuestos, el análisis de estos resultados se reduce a la observación de posibles interacciones en los termogramas obtenidos que se reflejarían en variaciones en el correspondiente al polvo cuando este está solo con respecto al de las mezclas físicas obtenidas con las distintas sustancias seleccionadas; Estas alteraciones pueden ser ancho del pico, cambios significativos en su posición y aparición o desaparición de nuevos picos.

Los termogramas obtenidos para los excipientes muestran un comportamiento similar en cuanto a la forma de los picos pero difieren significativamente en la ubicación de los mismos por lo que se puede inferir que

Resultados y Discusión

cada uno posee un comportamiento térmico particular que a su vez difiere del obtenido para la muestra. Por su parte los deslizantes presentan termogramas con mayor nivel de especificidad en cuanto a posición e intensidad de los picos.

Por su parte los termogramas de las mezclas del polvo con los excipientes en estudio, a las diferentes proporciones establecidas demostraron, que el polvo no presenta interacciones físicas o químicas con los excipientes que se evaluaron. La [Figura 3.26](#) muestra las curvas térmicas de algunas de las mezclas binarias formadas entre el polvo y los excipientes en diferentes proporciones; en estos termogramas se observa que las transiciones características del polvo y la de los excipientes no presentan cambios respecto a las transiciones detectadas en el estudio individual de cada sustancia. La transición endotérmica del polvo cercana a 160°C y la falta de aparición de nuevos picos en cada una de las mezclas confirman la ausencia de incompatibilidad química entre el polvo y los excipientes estudiados

Resultados y Discusión

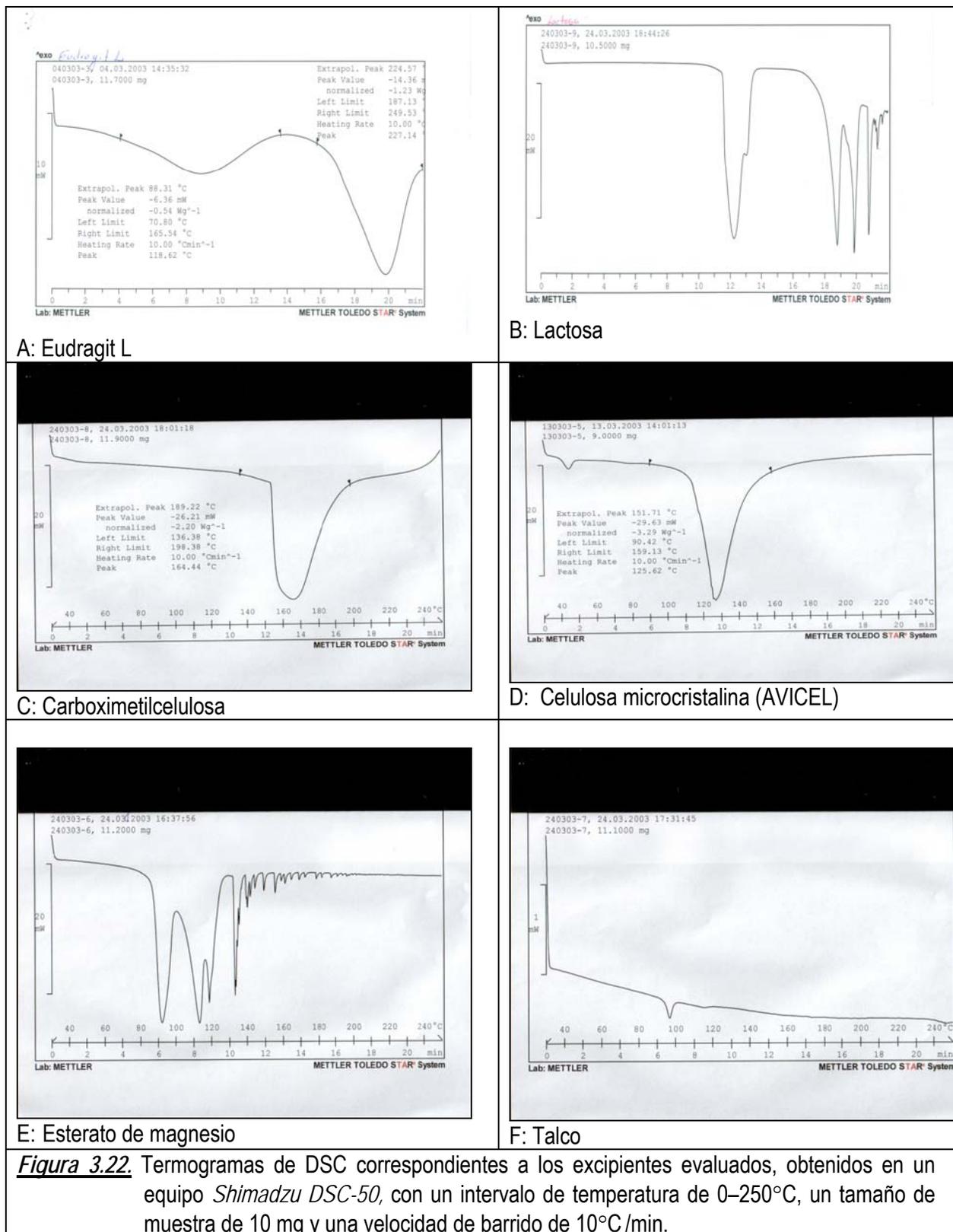
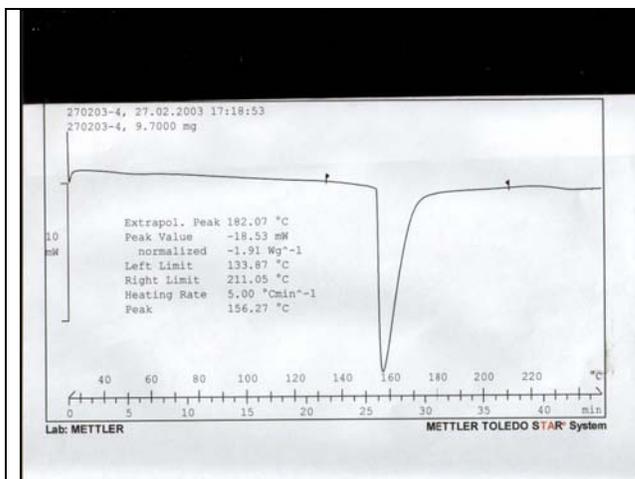
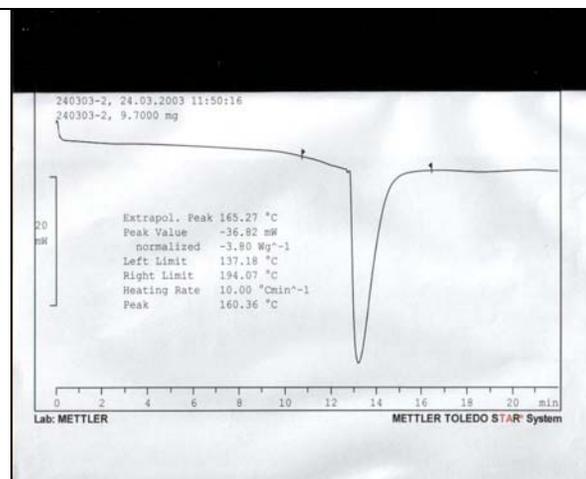


Figura 3.22. Termogramas de DSC correspondientes a los excipientes evaluados, obtenidos en un equipo *Shimadzu DSC-50*, con un intervalo de temperatura de 0–250°C, un tamaño de muestra de 10 mg y una velocidad de barrido de 10°C/min.

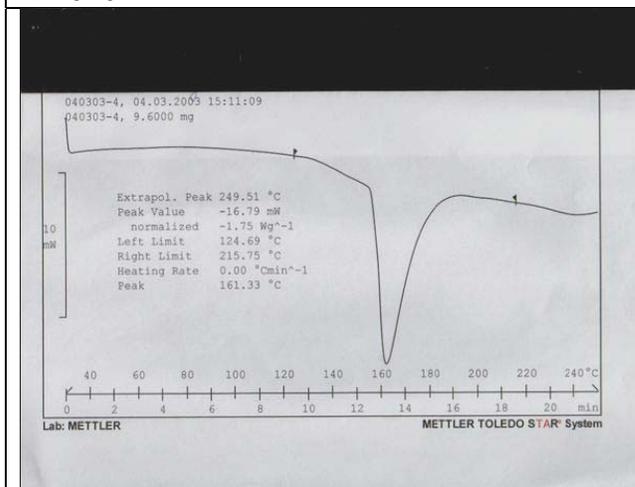
Resultados y Discusión



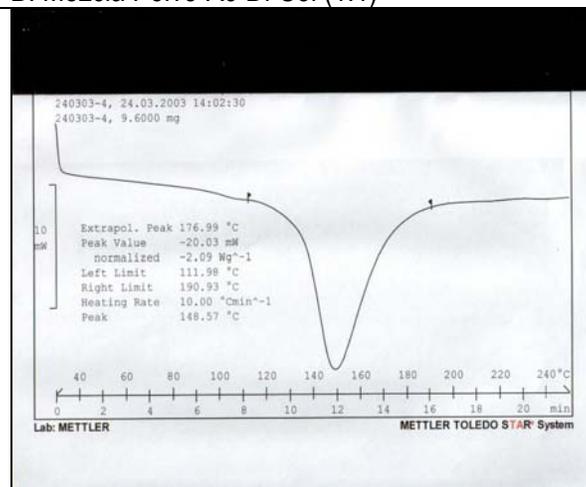
A: Polvo



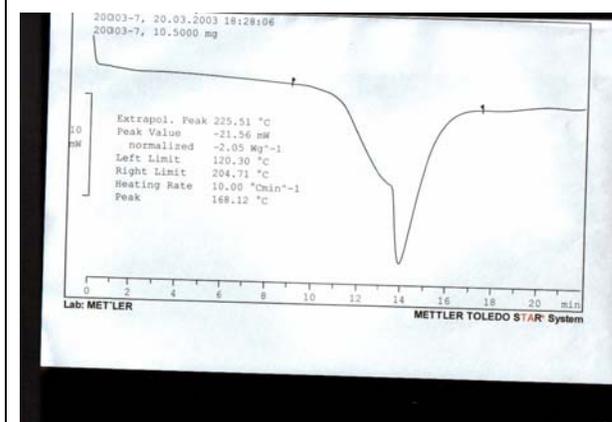
B: Mezcla Polvo-Ac-Di-Sol (1:1)



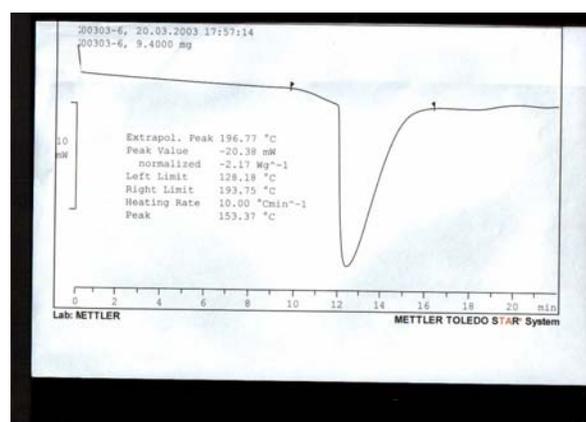
C: Mezcla Polvo - Eudragit L (1:1)



D: Mezcla del polvo: Eudragit L: Talco-Estearato (5,0: 0,6: 0,25%)



E: Polvo: Lactosa (1:1)



F: Polvo: AVICEL(1:1)

Figura 3.23. Registro de Calorimetría diferencial de barrido correspondiente al polvo y las mezclas del polvo con los excipientes evaluados; obtenidos en un equipo *Shimadzu DSC-50*, con intervalo de temperatura de 0–250°C, tamaño de muestra de 10 mg y velocidad de barrido de 10°C /min.

María Elisa Jorge Rodríguez

3.4.6. Estudios de estabilidad inicial

La estabilidad inicial del polvo se evaluó usando como herramientas analíticas la Cromatografía en Capa delgada y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, técnicas validadas en los *epígrafes 3.2.1 y 3.4.2* respectivamente; la selección de estas técnicas se justifica por la posibilidad de identificar y cuantificar la Cucurbitina presente en el polvo en presencia de otros aminoácidos y compuestos afines sin que estos constituyan interferencias. El diseño del estudio, siguiendo la metodología propuesta por *Steele G., 2004*, incluyó realizar durante tres meses seis determinaciones, además de la inicial. Como resultado se obtuvo lo siguiente:

La observación de las características organolépticas del polvo permitió comprobar que el mismo no sufrió alteraciones visuales, mantuvo su color y apariencia con respecto a la muestra que no fue sometida a las condiciones señaladas. La Cromatografía en Capa Delgada permitió identificar la Cucurbitina en todas las muestras, obteniéndose además, las cuatro manchas adicionales, características del polvo. Los valores de Rf obtenidos para cada mancha, aparecen en la Tabla 1.3 (Anexo I). Al comparar los mismos se observa una gran similitud entre los valores correspondientes a cada muestra con respecto a los resultados obtenidos para la muestra inicial, lo que sugiere que los metabolitos de interés, aminoácidos, no sufren alteraciones almacenados a las condiciones estudiadas.

Al aplicar la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, para determinar el contenido de Cucurbitina y su posible cambio bajo las condiciones evaluadas, se obtuvieron resultados muy satisfactorios que aparecen reflejados en la Figura 3.24, donde se puede observar que durante los tres meses que abarcó el estudio no hay cambios significativos en el porcentaje de Cucurbitina, el cual se mantiene en el rango reportado por *André P, 1997*, para semillas de *Cucurbita spp* (0,4 a 0,8% de Cucurbitina).

Estos resultados, aunque no son concluyentes, son satisfactorios al mostrar que el polvo es estable a las condiciones estudiadas, que por su correspondencia con las condiciones climáticas de la zona geográfica donde se realiza el estudio (Normas ICH, 1996), permite proponer condiciones de almacenamiento y de manipulación del producto, con garantía de que mantendrá su estabilidad en cuanto a los metabolitos activos. En este caso no sería necesario protegerlo de la luz y su manipulación a las condiciones ambientales no afectaría su estabilidad, pudiéndose almacenar en habitaciones climatizadas con cierre hermético.

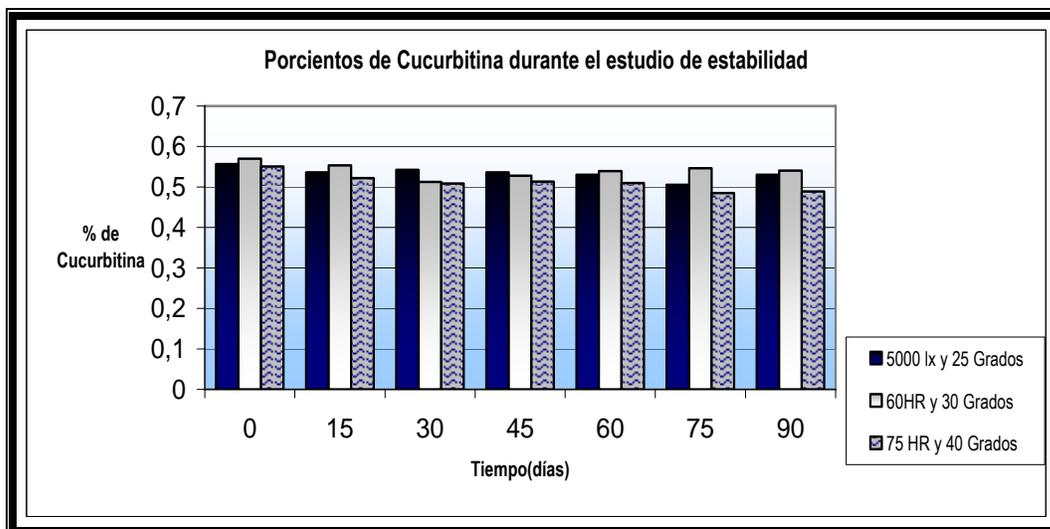


Figura 3.24. Comportamiento de la estabilidad del polvo, valorada por el porcentaje de Cucurbitina, determinada por HPLC. (Datos tomados de la [Tabla 3.34 \(Anexo L\)](#))

3.5. Evaluación preliminar de los subproductos obtenidos en el Método II.

3.5.1. Evaluación físico-química del aceite de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch

Para realizar la evaluación físico-química del aceite se utilizaron los ensayos que refieren las farmacopeas, *Eur. Ph., 2005* y *B.P., 2004*, para el control de calidad de los aceites grasos vegetales, extraídos por compresión, en cada caso se determinó el límite de especificación del parámetro o los límites de confianza de la media según corresponda.

El aceite graso, obtenido de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch es obtenido por expresión en frío posee como características organolépticas fundamentales que es un líquido viscoso, traslúcido, de color amarillo oscuro, casi pardo. Muy soluble en éter de petróleo, poco soluble en alcohol e insoluble en agua. Este aceite solidifica alrededor de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tiene una densidad relativa de aproximadamente $0,916\text{ (g/cm}^3\text{)}$. A continuación se presentan los resultados obtenidos al evaluar los ensayos que permitieron la caracterización físico - química del aceite:

La [Tabla 3.11](#) muestra los resultados promedios y los intervalos de confianza obtenidos para los parámetros Índice de refracción, Rotación óptica y Densidad (Datos tomados de la [Tabla J.1 \(Anexo J\)](#)). Dichos valores son similares a los obtenidos por *Younis Y. y col., 2000* para el aceite obtenido por método extractivo en una variedad africana de *Cucurbita Pepo* L.

Resultados y Discusión

Tabla 3.11. Resultados promedios obtenidos para los parámetros físico-químicos del aceite.

Parámetro	X ± SD	Intervalo de Confianza de la media
Índice de refracción	1,4677 ± 0,00025	1,46 - 1,47
Rotación óptica (°)	(+) 0,34 ± 0,01	0,30 - 0,38
Densidad (g/cm ³)	0,91 ± 0,01	0,88 - 0,93

Por su parte los resultados obtenidos en el Índice de saponificación y los ensayos Índice de Acidez (cifra que expresa en mg la cantidad de hidróxido de potasio necesaria para la neutralización de los ácidos libres presentes en 1g de aceite), el Índice de Peróxido (cifra que expresa, en miliequivalentes de oxígeno activo, la cantidad de peróxido contenida en 1.000g de aceite) y el Índice de saponificación, aparecen en las Tablas J.2 y J.3 y J.4 (Anexo J), respectivamente.

Estos resultados se procesaron, utilizando el método de Bowker, para determinar el Límite superior de especificación correspondiente a cada ensayo, dichos valores se reflejan en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 Valores promedios y límite superior de los Índices de Acidez y de Peróxido del aceite.

Parámetro	X ± SD	LSE (Límite Superior)
Índice de saponificación (Is)	127,16 ± 0,3	128,23, (No superior a 129)
Índice de Acidez (Ia)	7,67 ± 0,4	8,74 (No superior a 9)
Índice de Peróxido (Ip)	1,85 ± 0,4	2,86 (No superior a 3)

Finalmente se determinó el comportamiento de la absorbancia del aceite, empleando como solvente octano. Este parámetro también es reportado como índice de calidad de los aceites grasos vegetales. La Figura 3.25 muestra que el aceite presenta un máximo de absorción a 236 nm, este valor no aparece reportado en la literatura consultada, encontrándose solo el máximo de absorción obtenido para la variedad Cucurbita Pepo L., en el mismo solvente, por Lankmayr E. y col., 2004, quienes obtuvieron una $\lambda_{\text{máx.}}=226$.

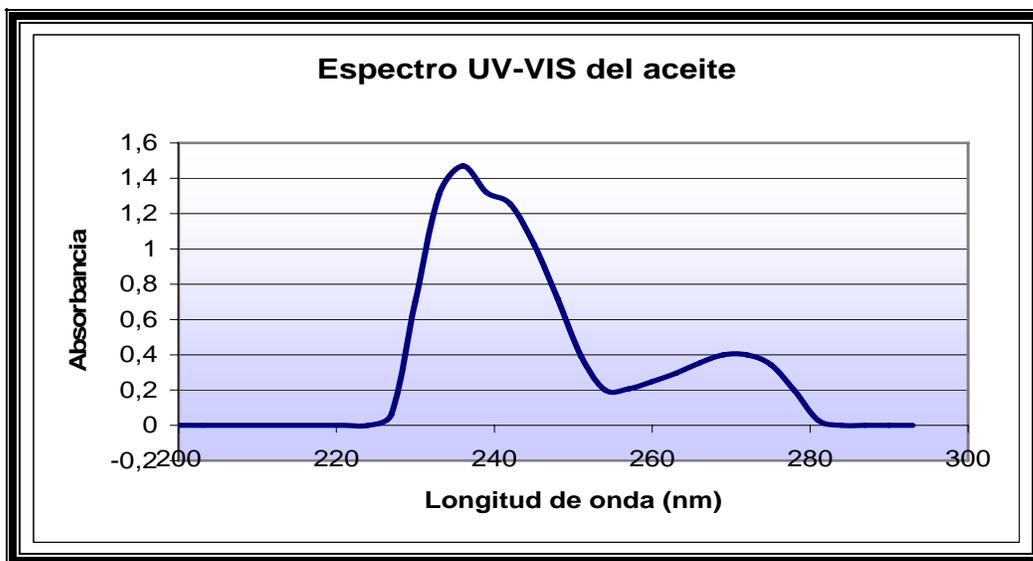


Figura 3.25. Espectro UV-VIS del aceite obtenido de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch

Para evaluar los resultados obtenidos en la caracterización físico-química del aceite se tuvieron en cuenta los índices reportados en la *Farmacopea Europea*, para aceites vírgenes obtenidos por compresión. Si se comparan los valores obtenidos para el aceite con los descritos en la Tabla J.5 (Anexo J), para los aceites vírgenes de oliva, trigo, ricino y almendras, se observa que el índice de acidez y de peróxido, en nuestro caso, son superiores a los reportados por la farmacopea para estos aceites, aspecto que deberá ser explicado cuando se determine cuantitativamente la composición del aceite obtenido.

3.5.2. Análisis bromatológico del subproducto sólido (testa y almendra) con vistas a su uso en la alimentación animal

El *Anexo K* muestra los resultados del análisis bromatológico realizado al subproducto obtenido en el método II. De dichos resultados es significativo el porcentaje de proteína bruta presente, comparable con el porcentaje presente en la soya, lo que justifica que este producto deba ser evaluado para su utilización en la alimentación animal.

CONCLUSIONES

- Los procedimientos tecnológicos utilizados para la obtención del polvo en el presente trabajo (Método II) permiten desgrasar y decorticar la semilla, y obtener dos productos colaterales (aceite y testa) de interés farmacéutico y en la alimentación animal, respectivamente, lo que supera al método empleado actualmente en los laboratorios de fitofármacos del País (Método I).
- El Método II es una alternativa más recomendable que el Método I, por facilitar las operaciones de pulverización y tamizado, lo que permite aumentar el porcentaje de polvo.
- Al calcular la ganancia para cada método se obtuvo para el Método I un valor de -302,06 pesos. Y para el Método II un valor de 59,93 pesos, lo que muestra que en el Método I no existe ganancia, pues el costo de la producción es mayor que el valor de ésta.
- Los estudios analíticos demostraron que la reacción de Ninhidrina resulta adecuada para determinar los aminoácidos en el polvo, seleccionándose como condiciones óptimas la temperatura de 60°C, calentado durante 40 minutos y la lectura debe realizarse durante los primeros diez minutos.
- Los ensayos cualitativos y cuantitativos evaluados cumplen con los parámetros establecidos y permiten establecer, por primera vez en Cuba, la monografía analítica para el control de la calidad del polvo como ingrediente activo.
- La Técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución validada resultó ser lineal, precisa, específica y sensible para determinar cuantitativamente la Cucurbitina en el polvo, lo que posibilitó su aplicación en los estudios de estabilidad inicial del polvo.
- Los estudios de preformulación, realizados por primera vez, permitieron caracterizar el polvo obtenido como un producto con ligera higroscopicidad, pobre fluidez, que es compatible con los excipientes evaluados.
- El estudio de estabilidad inicial desarrollado aportó que el polvo es estable a las condiciones estudiadas y sugiere su manipulación en habitaciones climatizadas, sin protección de la luz
- La evaluación físico-química preliminar del aceite y la testa, productos colaterales del desgrase y tamizado de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch, permitió disponer de una caracterización cualitativa de estos productos, lo que unido a los resultados del análisis económico, permite asegurar que es posible diversificar la producción, eliminar residuos llevándose a cabo un proceso limpio y económicamente viable.

RECOMENDACIONES

- Modificar el método de obtención del polvo de semillas de *Cucurbita* spp., propuesto en la Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos de Cuba, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la aplicación de los nuevos procedimientos evaluados en esta Tesis Doctoral.
- Aplicar la monografía analítica propuesta en el presente trabajo para realizar el control de la calidad del polvo de semillas de *Cucurbita* spp. como ingrediente activo.
- Concluir los estudios de preformulación y tener presente los resultados de este trabajo, con énfasis en la higroscopicidad y pobre fluidez del polvo, para la futura elaboración de formas farmacéuticas con acción antiparasitaria.
- Continuar los estudios de los productos colaterales, aceite y testa, de interés farmacéutico y para la nutrición animal, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Abourashed EA, Khan I.** Determination of Pharthenolide in selected feverfew products by High Performance Liquid Chromatography. *J AOAC Int.* 2000; 83(4): 789-92.
2. **Agrawal Kaul N, Paradhkar AR, Mahadik KR.** HPTLC method for guggulsterone. Quantitative determination of E-and Z-guggulsterone in herbal extract and pharmaceutical dosage form. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 36(9): 33-41.
3. **Akers, M. J.** Preformulation testing of solid oral dosage forms. *Methology, management and evaluation.* *Can. J. Pharm. Sci.* 1976; 11: 1-10.
4. **Amidon G.** Physical and mechanical property characterization of powders. En: *Physical characterization of pharmaceutical solids.* New York: Ed. Ohmeda; 1999. 281-318.
5. **Amorin CZ, Marques AD, Cordeiro RS.** Screening of the antimalarial activity of plants of the Cucurbitaceae family. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86(2): 177-80.
6. **Andre Patrice, Thierry Valerie, Guillaumet Gerald.** Method for synthesizing Cucurbitine. United States Patent 5, 696, 273. 1997 December 9.
7. **Areces A. E.** Medicina verde, regalo de la naturaleza. *Revista Bohemia.* La Habana 2000; 38 (82): 49, 21.
8. **Arteche A, Vanaclocha B y Guenechea JI. Editores.** *Fitoterapia. Vademecum de Prescripción. Plantas medicinales.* 3ª ed.. Barcelona: Masson; 1998.
9. **Aulton ME.** *Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas.* 2ª Ed. Madrid. S.A. España: Elsevier; 2004.
10. **Bailenger J, Sequin F.** Antihelmintic activity of preparations from squash seeds. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 1966; 105 (4): 189-200.
11. **Bilia A, Bergonzi MC, Morgenni G, Vincieri, F.** Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 213: 199-208.
12. **Blanco Gomiz A, Picinelli LM, Gutierrez MD Alvarez JJ.** Determination of amino acids in apple extracts by High Performance Liquid Chromatography. *Cromatographia* 1990; 29 (3-4): 155-160.
13. **Bravo, R.** Contribución al estudio fitoquímico de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch. *An R Acad Farm.* 1974; 40 (3-4): 463-473.
14. **British Pharmacopoeia.** London: Her Majesty's Stationery Office, 2004.
15. **Brown G.** Flotación. En *Operaciones Básicas de la Ingeniería Química.* 2da edición. España. Editorial Graficas Condal – Clot. 1959. p. 106-114.
16. **Bruneton J. Pharmacognosie.** *Phytochimie. Plantes Medicinales.* 3ª ed. París: Technique et Documentation-Lavoisier; 1999.
17. **Burriel F.** Sensibilidad y selectividad de las reacciones. En: *Química Analítica Cualitativa.* 11na ed. Madrid: Ed. Paraninfo; 2001. P. 91-112.
18. **Callahan JC, Cleary GW y Elefant M.** Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Dev Ind Pharm.* 1982; 8(3): 355-369.
19. **Calull R, Marce M, Guasch J, y Borrul F.** Determination of free amino acid content of varietal red wines from the Tarragona region. A study of the varietal influence. *Acta Alimentaria* 1990; 19(1): 47-53.
20. **Cañigueral S, Vila R.** *Curso de Fitoterapia y su aplicación en la oficina de Farmacia.* Barcelona: Profármaco S.A;1996.
21. **Cañigueral S.** *Fitoterapia: Concepto y límites. Fuentes de información.* En: Arteche A, Vanaclocha B. y Guenechea JI. Editores. *Fitoterapia. Vademecum de Prescripción. Plantas medicinales.* 3ª ed. Barcelona: Masson; 1998. p. 182-199.

Bibliografía

22. Cañigüeral S, Vila, R y Wichtl, M. Editores. Plantas Medicinales y Drogas vegetales. Milán: OEMF; 1997.
23. Cañigüeral, S. Preparados galénicos y formas de administración en fitoterapia. Memorias del curso iberoamericano de fitoterapia clínica. Guatemala: Editorial Sintesis; 2000.
24. Carr R. Particle behavior, storage, and flow. Brit Chem Eng. 1970; 15:1541-1549.
25. Carr R. Classifying flow properties of solids. Chem Eng. 1965; 1:69-72.
26. Cuellar A, Miranda M. Farmacognosia y Química de los Productos Naturales. Cuba: Ed. Universidad de La Habana; 2000.
27. Dar A. Tecnología farmacéutica. Zaragoza, España: Editorial Acribia; 1981.
28. De Souza KCB, Petrovick PR, Bassani VL y González Ortega G. The adyuvantes Aerosol 2000 and Gelita Sol-P. Influence on the Technological Characteristics of spray-Dried Powders from *Passiflora edulis* var. flavicarpa. Drug Development and Industrial Pharmacy 2000; 26(3): 331-336.
29. De Souza TP, Bassani VL, Gonzalez Ortega G, Dalla Costa TC, Petrovick PK. Influence of adjuvants on the dissolution profile of tablets containing high doses of spray-dried extract of *Maytenus ilicifolia*. Pharmazie 2001; 56 (9): 730-3.
30. Díaz LM, Souto C, Gómez-Amoza JL, Martínez-Pacheco R. Eudragit RS as major excipient in controlled release tablets for plant dry extracts. Pharmazie 1997; 52: 466-470.
31. Díaz LM, Souto C, Gómez-Amoza JL, Martínez-Pacheco R. Evaluation of Eudragit E as excipient in tablets of dry plant extract.. S.T.P Pharma 1996; 6: 105-109.
32. Díaz Obregon D, Lloja Lozano L, Carbajal Zuniga V. Preclinical studies of *Cucurbita maxima* (pumpkin seeds) a traditional intestinal antiparasitic in rural urban areas. Rev Gastroenterol Peru 2004; 24(4): 323-7.
33. Díaz, LM. Diseño y evaluación de comprimidos convencionales y de cesión controlada de extractos secos (*Plantago lanceolata*). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España: Editorial síntesis; 1995.
34. Duez P, Chamart S, Hanocq M, Sawadogo M. Determination of Cucurbitine in *Cucurbita* spp. seeds by HPTLC densitometry and HPLC. Journal of planar chromatography 1988; 1: 313-316.
35. Dufour P y Gendre P. Long- term mucosal alterations by sennosides and related compounds Pharmacology 1988; 36: 194-202.
36. Dunnill M y Fowden L. The amino acid od seeds of the cucurbitaceae. Phytochemistry 1965; 4: 933-944.
37. Duvian G. Treatment of intestinal parasitism. J. Med. Bordeaux 1953; 130: 44-51.
38. Eder M, Mehnert W. The important of concomitant compounds in plant extracts. Pharmazie 1998; 53 (5): 285-93.
39. El-Adawy TA, Taha KM. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. J Agric Food Chem. 2001; 49(3):1253-9.
40. Elisha EE. La actividad antihelmíntica de algunas plantas iraquí de las Curcurbitaceae. Int. J. Crude Drug Res 1997; 25: 153-157.
41. Espinosa M. Normalización, Metrología y Control de la calidad. La Habana. Pueblo y Educación; 1987.
42. Esteban H. Pharmacographic study of the seeds of Cucurbita Maxima and varieties. Anales Fac. Farm., Universidad Mayor de San Andrés 1954; 5: 86-98.
43. EURACHEM Guidance Document No. 1/WELAC Guidance Document No. WGD 2: Accreditation for chemical laboratories: Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of standards and ISO/IEC Guide 25, 1993.
44. EURACHEM Guide (1998) "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". ISBN: 0-948926-12-0. Reino Unido.
45. European Pharmacopoeia. 5ta ed. Strasbourg, France. Council of Europe, 2005.

María Elisa Jorge Rodríguez

46. **European Medicines Agency, EMEA**, Working part on Herbal Medicinal products (HMPWP), stability testing of HD, HDP, and HMP, guidelines 25, 2005: 7-17
47. **Evans WC**. Trease and Evans. Pharmacognosy; 15th.ed. Reino Unido: Editorial Saunder; 2000.
48. **Fang S**. Acción farmacológica de la Cucurbitina contra Shistosoma, Japonicum. Scientia Sinica 1961; 10: 845-851.
49. **Faulí Trillo C**. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Ed. Luzán 5 S.A.; 1993.
50. **Fernández, A**. Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos. La Habana, Cuba; 1996.
51. **Flores J**. Farmacología Humana. Cuarta Edición. España: Massan salvat, Medicina; 1999.
52. **Friedman M**. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. A review. *Agric. Food Chem.* 2004; 52: 385-406.
53. **Fukuda SP, Roig SM, Prata LF**. Application of the acid Ninhydrin method as a screening test for the detection of whey addition in milk. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 1996; 16: 52-56.
54. **Gómez Amoza JL**. Sólidos pulverulentos. En Vila Jato JL. Tecnología Farmacéutica. 1ra Edición. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1997. 75-135.
55. **González MJ, López HJ, Sormal LJ, y Oruña CMJ**. Determination of amino acid in Green Beans by derivatization with Phenylisothiocyanate and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection. *Journal of Chromatographic Science* 1997; 35: 181-185.
56. **González E, Montenegro MA, Nazareno MA, López de Mishima BA**. Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). *Arch Latinoam Nutr.* 2001; 51(4): 395-9.
57. **González, E**. Contribución al estudio farmacológico (antihelmíntico) de las semillas de *Cucurbita Máxima* Duch y de su principio activo, la Cucurbitina. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 1974; 40 (3): 475-483.
58. **Gosell-Willians M, Davis A, O'Connor N**. Inhibition of testosterone-induced hyperplasia of the prostate of spraguedawley rats by pumpkin seed oil. *J Med Food* 2006; 9(2): 284-6.
59. **Guenechea J**. La fitometría en la farmacia. En *Vademecum de Prescripción. Plantas medicinales*. 3ª ed.. Barcelona: Masson; 1998. p. 156-182.
60. **Guenkov E**. Fundamentos de la horticultura cubana. 1ra. Edición. La Habana: Ed. Ciencia y Técnica; 1969. p. 217-233;.
61. **Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos**. Ciudad de la Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1992. P.39.
62. **Hase K, Shigetoshi K, Purusotam B, y Tsuneo N**. Hepatoprotective effects of traditional medicines. Isolation of the active constituent from seeds of *Celosia argentea* and *Cucurbita moschata*. *Phytotherapy Research* 1996; 10: 387-392.
63. **He Y, Zhang QW, Zhang YX, Sun J, Wang ZJ**. Study on applying chromatographic fingerprints to establishing quality criterion of processed tuber of *Pinellia pedatisecta*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2004; 29(9): 874-6.
64. **Hodisan T, Culea M, Cimpoi C, Cot. A**. Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plant extracts. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 18: 319-323.
65. **Hsieh CL, Hsiung KP, Su JC**. Determination of Lysine with Ninhydrin-ferric reagent. *Anal. Biochem.* 1995; 224: 187-189.
66. **Hu BQ, Shi YJ, Huang P**. Determination of stilbene derivative in shengfa powders by HPLC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2002; 27 (12): 913-48.
67. **Hurst PL, Sinclair BK, Eason JR**. Amino acids interfere with the Ninhydrin assay for Asparagine. *Food Chem* 1995; 53: 467-469.

68. ICH, **Harmonised Tripartite Guideline**. "International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability". Part VIII. Federal Register. FDA. USA, 1996; 60(40): 11260.
69. ICH, **Harmonised Tripartite Guideline**. "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of analytical procedures and Methodology, ICH-Q2 A y B, Geneva 1996.
70. **Isimi CY, Nasipuri K**. Effects of the diluent type on compressional characteristics of *Anogeissus leicarpus* and *prosopis africana* tablet formulation. *Acta Pharm* 2003; 53(1): 49-56.
71. **Jones D, Owen AG, Farrar JF**. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solution and soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry* 2002; 34: 1893-1902.
72. **Jorge E, Saucedo Y**. Caracterización de la semilla de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch), con fines farmacéuticos. *Revista Cubana de Farmacia* 1995; 31: 212-214.
73. **Kabir D, Salem JKJ, Kumar S, Khan Z**. The micelle induced interaction between Ninhydrin and Tryptophan. *J. Colloid Interface Sci.* 1999; 215: 9-15.
74. **Kaupp G, Naimi-Jamal MR, Schmeyers J**. Quantitative reaction cascades of ninhydrin in the solid state. *Chemistry* 2002; 8: 594-600.
75. **Kleinebudde P**. Roll compactation / dry granulation: pharmaceutical application. *European Journal of Pharmaceuticals* 2004; 58: 317-326.
76. **Koike K, Li W, Liu L, Hata E, Nikaido T**. New phenolic glycosides from the seeds of *Cucurbita moschata*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2005; 53(2): 225-8.
77. **Kommánaboyin B y Rhodes CT**. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999; 25(7):857-868.,
78. **Kopelman S, Augsburg L**. Excipient compatibility study of *Hipericum perforatum* extract (St. John's Wort) using similarity metrics to track phytochemical profile changes. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 237(1-2): 35-46.
79. **Lan YY, Wang AM, Wang YL, Li YJ, He X, Liu LN**. Qualitative and quantitative studies on qianliebeixi capsules. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2003; 28 (6): 513-5.
80. **Lankmayr E, Mocak J, Serdt K, Balla B, Wenzl T, Bandoniene D, Gfrerer M y Wagner S**. Chemometrical classification of pumpkin seed oil using UV-Vis, NIR and FTIR spectra. *J. Biochem. Biophys Methods* 2004; 61: 95-106.
81. **Laskar S, Sinhababu A, Hazra KM A**. Modified spray reagent for the detection of amino acids on thin-layer chromatography plates. *Amino Acids* 2001; 21: 201-204.
82. **Liu C, Xu X, Xu X, Luo Q, Peng Q**. Content determination of psoralen in root of *Ficus hitra* by HPLC method. *Zhong Yao Cai* 2004; 27(8): 582-3.
83. **Macchi FD, Shen FJ, Keck RG, Harris RJ**. Amino acid analysis, using postcolumn ninhydrin detection, in a biotechnology laboratory. *Methods Mol. Biol.* 2000; 159: 9-30.
84. **Mackie A. y Stewar G**. In vitro test of chemical compounds an *Ascaris lumbricoides* and *Fasciola hepática*. *Brí. J. Pharmacol.* 1955; 10: 7.11.
85. **Magne C, Larher F**. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free Proline. *Anal. Biochem.* 1992; 200: 115-118.
86. **Mamoun O**. Síntesis de metil 3-Amino-3-pirrolidincarboxilatos: Un conveniente acceso a la Cucurbitina y sus análogos. *Synthetic Communications* 1995; 25: 1295-1302.
87. **Martindale W**. The Extra Pharmacopoeia. 32th edition. London, The Pharmaceutical Press. 1999. p. 167.
88. **Matus Z, Molnar P, Szabo LG**. Main carotenoids in pressed seeds (Cucurbitae semen) of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* convar. pepo var. styriaca). *Acta Pharm Hung* 1993; 63(5): 247-56.
89. **Meier B**. From medicinal plant to phytotherapeutic drug. *Ther. Umsch.* 2002; 59 (6): 275-82.

Bibliografía

90. **Mihranian VH y Abou-Chaar CI.** Estudio fitoquímico de especies de *Cucurbita* Spp. *Lloydia* 1968; 31: 23-29.
91. **Monteiro JH.** New synthesis of the Amino-acid (+)-Cucurbitine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1973: 2.
92. **Moore S, Stein HA.** Modified Ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 1954; 211: 907-913.
93. **Morimoto Y.** Enzymes and catalysts. II. Pig liver. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1987; 35(9): 3845-3849.
94. **Moulin M, Deleu C, Larher FR, Bouchereau A.** High Performance Liquid Chromatography determination of Pipecolic Acid after precolumn Ninhydrin derivatization using domestic microwaves. *Anal. Biochem.* 2002; 308: 320-327.
95. **Murkovic M, Hillebrand A, Winkler J, Leitner E, Pfannhauser W.** Variability of fatty acid content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.). *Z Lebensm Unters Forsch.* 1996; 203(3): 216-9.
96. **Murkovic M, Hillebrand A, Winkler J, Pfannhauser W.** Variability of Vitamin E content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.). *Z Lebensm Unters Forsch.* 1996; 202(4): 275-8.
97. **Nagel K y Peck E.** Investigating the effects of the Power Flow Characteristics of Theophylline Anhydrous Power Formulations. *Drug Development and industrial Pharmacy* 2003; 29(3): 227-287.
98. **Navarro C.** *El mundo vegetal, nuestro aliado.* *Ars Pharm* 1994; 35: 419-430.
99. **Navarro C.** Uso racional de las plantas medicinales. *Pharmaceutical Care España* 2000; 2: 9-19.
100. **OMS.** Pautas para la evaluación de medicamentos herbarios. Ginebra: Salvat; 1991.
101. **Onunkwo GC, Egeonu HC, Adikwu MU, Olowosulu AK.** Some physical properties of tableted seed of *Garcinia kola* (HECKEL). *Ceska Slov. Farm.* 2001; 50(2): 92-4.
102. **Palma S, Luján C, Llabot J, Barboza G, Manzo R y Allemandi D.** Desing of *Peumus boldus* tablets by direct compresión using a novel dry plant extract. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 233: 191-199.
103. **Palma S, Manzo RH, Allemandi DA.** Dry plant extract loaded on fumed silica for dired compression: preparation an preformulation *Pharm. Dev. Technol.* 1999; 4(4): 523-530.
104. **Peshcl LA.** Measurement and evaluation of mechanical properties of powders. *Powder Handling & Processing*; Vol 1; Pág.135-141; 1989
105. **Plaizier-Vercammen JA y Bruwier C.** Evaluation of excipientes for direct compression of the spray – dried extract of *Harpagophytum procumbens*. *S. T. P. Pharma* 1986; 2: 525-530.
106. **Prota G, Ponsiglione E.** On the reaction of Ninhydrin with Cysteine and its analogues. *Tetrahedron* 1973; 29: 4271-4274.
107. **Queiroz NA.** Toxicologic evaluation of acute and subcute oral adeministration of *Cucurbita maxima* seed extracts to rats and swine. *Journal of Ethnopharmacology* 1994; 43: 45-51.
108. **Rahman N, Kashif M.** Application of Ninhydrin to spectrophotometric determination of Famotidine in drug formulations. *Farmaco* 2003; 58: 1045-1050.
109. **Renimel I y Andre P.** Method for treatment of allergic disorders and cosmetic compositions using Cucurbitine. United States Patent number 5,714,164. 1998 Feb.3.
110. **Rivastava MC y Singh SW.** Antihelmintic activity of *Cucurbita máxima* seeds. *Indian Journal of Medical Research* 1967; 55(6): 629-632.
111. **Robineau L.** Hacia una farmacopea caribeña. Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. 8 Edición. Antioquia: Tramil; 1995: 204-206.
112. **Robineau L.** Hacia una farmacopea caribeña. Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. Seminario, 5 y 6 (Ed.), Livingston, Guatemala, Base-Terre, Guadalupe: TRAMIL; 1992: 133-135.

Bibliografía

113. **Rocksloh K, Rapp FR, Abu Abed S.** Optimization of crushing strength and disintegration time of a high-dose plant extract tablet by neural network. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 1015-1025.
114. **Roig JT.** Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Primera edición. La Habana: Gente Nueva; 1972.
115. **Royal Horticultural Society.** Manual de identificación de plantas perennes. Paris: Editorial Blume; 1998.
116. **Samejima K, Dairman, W, Stone J, Udenfriend S.** Condensation of Ninhydrin with aldehydes and primary amines to yield highly fluorescent ternary products. II. Application to the detection and assay of peptides, amino acids, amines, and amino sugars. *Anal. Biochem.* 1971; 42: 237-247.
117. **Saucedo Y y Rodríguez D.** Caracterización de la semilla de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch) con fines farmacéuticos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba; 1995.
118. **Schenkel F, Duez P y Hanocq M.** Stereoselective determination of Cucurbitine in *Cucurbita spp.* seeds by chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1992; 625 (2): 289-298.
119. **Schertz TD, Reiter R, Stevenson CD.** Zwitterion radicals and anion radicals from electron transfer and solvent condensation with the fingerprint developing agent Ninhydrin. *J. Org. Chem.* 2001; 66: 7596-7603.
120. **Schiebel-Schlosser G, Friederich M.** Phytotherapy of BPH with pumpkin seeds—a multicentric clinical trial. *Z Phytother* 1998;19:71–6.
121. **Schonberg A, Singer E.** The chemistry of Ninhydrin and other cyclic 1,2,3-tricarbonyl compounds. *Tetrahedron* 1978; 34: 1285-1300.
122. **Senden MH, Van Der Meer AJ, Limbor GH y Wolterbeek HTH.** Analysis of major tomato xylem organic acids and PITC-derivatives of amino acids by RP-HPLC and UV detection. *Plant and soil* 1992; 142: 81-89.
123. **Shavenberg P y París F.** Guía de las plantas medicinales. Barcelona: Ed. Omega; 1972.
124. **Sheng S y Kraft JJ.** A specific quantitative colorimetric assay for L-asparagine. *Anal. Biochem.* 1993; 211: 242-249.
125. **Shi JL, Liu Y, Xiao PG.** Studies on HPLC fingerprint of the hydrophilic constituents of Valeriana medicinal plants. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005; 30 (6): 426-9.
126. **Shiao SJ.** Actividad antiparasitaria de la Cucurbitina contra infecciones producidas por *schistosma japonicum*. *Sci. Sinica* 1962; II: 1527-1534.
127. **Skoog, DA., Leary G, James J.** Análisis Instrumental: Mc Graw-Hill; 2000.
128. **Soares LA, González Ortega G, Petrovick PR, Schmidt PC.** Dry Granulation and Compression of Spray-Dried Plant Extracts. *AAPS Pharm Sci Tech* 2005; 6 (3): 359-366.
129. **Soares LA, González Ortega G, Petrovick PR, Schmidt PC.** Optimization of Tablets Containing a High Dose of Spray-Dried Plant Extract. *AAPS Pharm Sci Tech* 2005; 6 (3): E367-E371.
130. **a) Souto C.** Operaciones con sólidos pulverulentos. En: Vila Jato JL. *Tecnología Farmacéutica*. 1ra Edición. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1997. p. 365-414.
b) Souto C. Preformulación. En: Vila Jato JL. *Tecnología Farmacéutica*. 1ra Edición. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1997. p. 27-69.
131. **Srisvastava A, Misra H, Verma RK, Gupta M.** Chemical fingerprinting of *Andrographis paniculata* using HPLC, HPTLC and densitometry. *Phytochem Anal.* 2004; 15(5): 280-5.
132. **STATGRAPHICS Plus ver. 4.** Manugistics Inc., Rockville, MD, U.S.A.; 1999. Available from <http://www.statgraphics.com>.
133. **a) Steele G.** Preformulation as an aid to product desing in early drug development. En: *Pharmaceutical preformulation and formulation*. 1ra ed. UK: Astrazeneca; 2004. p.175-196.

- b) **Steele G.** Preformulation predictions from small amounts of compound as an aid to candidate drug selection. En: *Pharmaceutical preformulation and formulation*. 1ra ed. UK: Astrazeneca; 2004. p. 21-89.
134. **Sun T.** Síntesis de la Cucurbitina. *Scientia Sinica* 1961; 10: 852-859.
135. a) **Suñe JM.** División de sólidos. En: *Faulí Trillo C. Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid: Ed. Luzán 5 S.A.; 1993. 261-270.
- b) **Suñe JM.** Extracción y destilación. En: *Faulí Trillo C. Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid: Ed. Luzán 5 S.A.; 1993. 249-254.
136. **Susan H, NguyenPho, W, Zito S.** Selected Physical and Chemical Properties of Commercial *Hypericum perforatum* Extracts Relevant for Formulated Product Quality and Performance. *AAPS Pharm Sci* 2001; 3 (4):1-18.
137. **Susan HK, Augsburg L.** Excipient compatibility study of *Hipericum perforatum* extracts (St. John's wort) using similarity metrics to track phytochemical profile changes. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 237(1-2): 35-46.
138. **Taha EA, Youssef NF.** Spectrophotometric determination of some drugs for osteoporosis. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2003; 51: 1444-1447.
139. **Takahashi K.** Specific modification of Arginine residues in proteins with Ninhydrin. *J. Biochem. (Tokyo)* 1976; 80: 1173-1176.
140. **Teodox H, Culea M, Cimpoi C, Agata C.** Separation, identification and quantitative determination of free amino acids from plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998; 18:319-323.
141. **The United States Pharmacopeia.** Pharmacopeial Forum. 24th ed. Rockville, MD: U.S.Pharmacopeial Convention, Inc.; 1998.
142. **Thompson M, Wood R.** Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.* 1995; 67: 49-56.
143. **Thompson M, Ellison, SL, Fajgelj Ales, Willetts P, Wood R.** Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 1999; 71(2): 337-348.
144. **Thompson F.** Storage de particulate. Solids. En *Handbook of Powder Science and technology*. Fayed, M. E. y Otten, L. (eds.), Van Nostrand Reinhold, New York (1984).
145. **Vanacloxta VB, Arteche A y Guenechea JL.** Fitoterapia, Vademecum de prescripción de Plantas medicinales. 4^a edición. España: Masson; 2003.
146. **Velázquez G.** Salud, Medicamentos y Tercer Mundo. Coordinadora de Organizaciones no gubernamentales para el desarrollo. Madrid: Editorial Lepala; 1996.
147. **Vennat B, Gross A, Pourrat A y Pourrat H.** Tablets of *Hamamelis* dry extract by direct compression: Comparative study of natural starches and starch derivatives. *Drug Der. Ind. Pharm.* 1993; 19:1357-1368.
148. **Vilá Jato JL.** Tecnología Farmacéutica, vol. I. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1997.
149. **Villar AM.** Farmacognosia General. Madrid: Ed. Síntesis; 1999.
150. **Vlietinck A.** Standarization, quality control and registration of herbal medicinal products. (ed.). 270. *Santa Fé de Bogotá: CYTED; 1999.*
151. **Von Eggelkraut-Gottanka SG, Abu Abeb S, Müller W, Schmidt PC.** Roller compaction and tableting of St. John's wort plant dry extract using gap width and force controlled roller compactor, I: granulation and tableting of eight different extract batches. *Pharm Dev Technol.* 2002; 7: 433-445.
152. **Von Eggelkraut-Gottanka SG, Abu Abeb S, Müller W, Schmidt PC.** Roller compaction and tableting of St. John's wort plant dry extract using gap width and force controlled roller compactor, II: study of roller compaction variables on granule and tablet properties by a factorial design. *Pharm Dev Technol.* 2002; 7: 447-455.

153. **Wells JL.** Pharmaceutical Formulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances. England: Ellis Horwood Ltd., Market Cross House, p. 209-211; 1988.
154. **Werterhoff K, Kaunzinger A, Wurglics M, Dressman J, Schubert-Zsilavec.** Biorelevant dissolution testing of St. John's Wort products. *J Pharm pharmacol* 2002; 54 (12): 615-21.
155. **Westendorff RF.** Pyrrolizidine alkaloids. General discussion. En: De Smet, PAGM., Keller, K., Hänsel, R y Chandler, RF. eds. Adverse effects of herbal drugs. Vol.I. Berlin: Springer Verlag; 1992. p.76-98.
156. **Williams RM y Glenn FJ.** Síntesis Asimétrica de S⁻(-)- Cucurbitine. *Tetrahedron Letters* 1992; 33: 6755-6758.
157. **Willians J C.** Flow and handling of solids; the design of solid handling plants. En *Enlargement and compactation of particulate solids*. Stanley – Wood N. G. (eds). London: Butterworth; 1983. p. 34-78.
158. **Wurglics M, Westerhoff K, Kaunzinger A, Wilke A, Baumeister A, Dreeman J, Schubert-Zsilavec M.** Comparasion of German St. John's wort products according to Hyperforin and total hypericin content. *J Am Pharm Assoc (Wash)* 2001; 41(4): 566-6.
159. **Yoinis Y, Ghirmay S, Al-Shihry SS.** African *Cucurbita pepo L.* Properties oil seed and variability in fatty acid composition of seed oil. *Phytochemistry* 2000; 54: 71-75.
160. **Yuferov VP, Froncish W, Kharitononkov IG, Kalmanson AE.** Electron paramagnetic resonance study of free radical products of the reaction of Ninhydrin with amino acids, peptides, and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1970; 200: 160-167.
161. **Zhang X.** Investigación y regulación de las plantas medicinales. Primeras jornadas Internacionales de Fitoterapia. Barcelona: Síntesis; 1998.

ANEXO A: Obtención del polvo.

Tabla A.1. Valores de porcentaje de polvo, obtenido utilizando los tamices del molino y los tamaños de partículas seleccionados (Método I).

Tamiz	(A) < 0.425 mm		(B) > 0.425 mm	
	% de Polvo (A)	X±SD	% de polvo(B)	X±SD
1,5	29,9	28,96 ± 1,11	72,4	72,82±1,37
	27,8		72,2	
	28,2		73,6	
	29,4		73,3	
	27,8		72,6	
2,0	25,9	25,92 ± 0,59	74,9	75.03±1,37
	27,2		75,6	
	26,6		74,8	
	25,3		76,4	
	24,6		74,8	

A: Tamaño de partículas menores de 0.425 mm;

B: Tamaño de partículas mayores de 0,425 mm;

X: Promedio del % de polvo obtenido, y

SD: Desviación Standard

Tabla A.2. Valores de porcentaje de polvo, obtenido utilizando los tamices del molino y los tamaños de partículas seleccionados (Método II).

Tamiz	(A) < 0.425 mm		(B) > 0.425 mm	
	% de Polvo (A)	X±SD	% de Polvo(B)	X±SD
1,5	36,9	37,2± 0,57	33,9	34,72 ± 0.39
	37,2		35,2	
	38,2		34,6	
	36,4		35,3	
	37,3		34,6	
2,0	35,7	36,2 ± 0,98	34,2	33,82 ± 0.42
	36,3		33,6	
	37,4		34,1	
	35,1		33,4	
	36,5		33,8	

A: Tamaño de partículas menores de 0.425 mm;

B: Tamaño de partículas mayores de 0,425 mm;

X: Promedio del % de polvo obtenido, y

SD: Desviación Standard

ANEXO B: Ensayos específicos.

Tabla B.1 Resultados obtenidos al aplicar el método de Bowker para determinar el límite de especificación en el ensayo de pérdida por desecación.

Pesafiltro vacío (g)	Pesaf.+polvo (g)	2horas (g)	4horas (g)	M2-M1(Final-Inicial) (g)	Humedad residual (%)
22.8413	23.8416	23.7796	23.7760	0.0656	6.56
22.2827	23.2855	23.2228	23.2218	0.0637	6.35
23.5954	24.5954	24.5328	24.5318	0.0636	6.36
23.3877	24.4106	24.3471	24.3446	0.066	6.45
23.3892	24.3898	24.3290	24.3275	0.0623	6.23
23.8225	24.8259	24.7653	24.7628	0.0631	6.29
23.1373	24.1381	24.0770	24.0746	0.0635	6.34
23.4125	24.4135	24.3535	24.3509	0.0626	6.25
23.0339	24.0499	23.9882	23.9862	0.0637	6.27
22.4313	23.4416	23.3803	23.3782	0.0634	6.28
21.9266	22.9264	22.866	22.864	0.0624	6.24
23.3153	24.3245	24.2637	24.2613	0.0632	6.26
22.6514	23.724	23.6600	23.6621	0.0619	6.14
22.8423	23.7447	23.6815	23.6808	0.0639	6.26
23.6247	24.6892	24.6251	24.6283	0.0609	6.09
23.4358	24.5111	24.4576	24.4491	0.0620	6.13
23.496	24.5576	24.4970	24.4934	0.0642	6.41
23.8136	24.8855	24.8298	24.8221	0.0634	6.30
231063	24.1950	24.1325	24.1309	0.0641	6.25
23.5823	24.656	24.5946	24.5935	0.0625	6.17
23.0056	24.0759	24.0148	24.0112	0.0647	6.41
22.4936	23.5575	23.4962	23.4957	0.0618	6.19
22.1635	23.3831	23.3287	23.3222	0.0609	6.08
23.2854	24.3831	24.3218	24.3207	0.0624	6.02
22.4569	23.5240	23.4636	23.4625	0.0615	6.11
Media (X) : 6,26				K = 3,18	LSE (Límite superior) LSE = X + KS LSE = 6.25+ 0,41 LSE = 6,66
Desv.Standard(SD): 0,13				a = 0,96 b = 6,58 c = 0,51	

Tabla B.2. Resultados obtenidos al aplicar el método de Bowker para determinar el límite de especificación en el ensayo de Cenizas totales.

Pi (g)	Pf (g)	Pt (g)	Pf-Pi (g)	(Pf-Pi)100 (%)	(Pf-Pi)100/Pt
17,4870	17,5545	1,0007	0,0675	6,75	6,75
17,7270	17,7846	1,0000	0,0576	5,76	5,86
18,7239	18,7916	1,0005	0,0677	6,77	6,77
22,0314	22,0997	1,0001	0,0683	6,83	6,83
25,6408	25,7006	1,0004	0,0598	5,98	5,98
15,7205	15,7881	1,0000	0,0676	6,76	6,76
22,2423	22,3102	1,0004	0,0679	6,79	6,79
16,1753	16,2427	1,0002	0,0674	6,74	6,74
18,5600	18,6255	1,0001	0,0655	6,55	6,55
19,3458	19,41132	1,0005	0,06552	6,55	6,55
18,7564	18,8249	1,0004	0,0685	6,85	6,85
17,5020	17,5690	1,0004	0,0670	6,70	6,69
22,0500	22,1149	1,0007	0,0649	6,49	6,49
18,7256	18,7908	1,0000	0,0652	6,52	6,52
25,6256	25,6923	1,0001	0,0667	6,67	6,67
22,2923	22,3580	1,0005	0,0657	6,57	6,57
15,7045	15,7640	1,0008	0,0595	5,95	5,95
22,0892	22,1527	1,0000	0,0635	6,35	6,35
16,1798	16,2463	1,0005	0,0665	6,65	6,65
17,4947	17,5612	1,0002	0,0665	6,65	6,65
18,5280	18,5935	1,0000	0,0655	6,55	6,55
19,2987	19,3632	1,0003	0,0645	6,45	6,45
17,3967	17,4645	0,9987	0,0678	6,78	6,79
16,2876	16,3512	1,0006	0,0636	6,36	6,36
17,4870	17,5545	1,0007	0,0675	6,75	6,75
Media (X) : 6,54	K= 3,18		LSE (Límite superior)		
Desv.Standard(SD): 0,29	a = 0,97		LSE = X + KS		
	b = 6,58		LSE = 6.54+ 0,92		
	c = 0,51		LSE = 7,46		

Tabla B.3. Resultados obtenidos al aplicar el método de Bowker para determinar el límite de especificación en el ensayo de Cenizas insolubles en Ácido Clorhídrico.

Pi (g)	Pf (g)	Pt (g)	Pf-Pi (g)	(Pf-Pi)100 (%)	(Pf-Pi)100/Pt
17,4870	17,5073	1,0007	0,0203	2,03	2,03
17,7270	17,7472	1,0000	0,0202	2,02	2,02
18,7239	18,7477	1,0005	0,0238	2,38	2,38
22,0314	22,0484	1,0001	0,0170	1,70	1,69
15,7205	15,7358	1,0000	0,0153	1,53	1,53
22,2423	22,2664	1,0004	0,0241	2,41	2,41
16,1753	16,2027	1,0002	0,0274	2,74	2,74
16,6785	16,7019	1,0004	0,0234	2,34	2,34
9,6683	9,6875	1,0004	0,0192	1,92	1,92
9,1196	9,1454	1,0005	0,0258	2,58	2,58
16,7407	16,7639	1,0005	0,0232	2,32	2,32
16,5288	16,5487	1,0009	0,0199	1,99	1,99
21,1116	21,1388	1,0001	0,0272	2,72	2,72
17,6777	17,6996	1,0008	0,0219	2,19	2,19
18,5258	18,5525	1,0009	0,0267	2,67	2,67
9,4617	9,4898	1,0000	0,0281	2,81	2,81
15,6934	15,7188	1,0004	0,0254	2,54	2,54
16,2354	16,2593	1,0002	0,0239	2,39	2,39
9,1167	9,1403	0,9890	0,0236	2,36	2,39
21,1094	21,1350	1,0007	0,0256	2,56	2,56
18,6835	18,7051	1,0000	0,0216	2,16	2,16
22,0722	22,0920	1,0000	0,0198	1,98	1,98
15,6910	15,7119	1,0004	0,0209	2,09	2,09
22,2145	22,2321	1,0008	0,0176	1,76	1,76
16,1545	16,1801	1,0005	0,0256	2,56	2,56
Media (X) : 2,27	K = 3,18		LSE (Límite superior)		
Desv.Standard(SD): 0,35	a = 0,96		LSE = X + KS		
	b = 6,57		LSE = 2,27+1,10		
	c = 0,51		LSE = 3,37		

Tabla B.4. Valores de los ensayos específicos reportados en la Farmacopea Europea, 2002 para productos farmacéuticos obtenidos de plantas medicinales.

Planta (Parte utilizada)	Pérdida por desecación (%)	Cenizas Totales (%)	Cenizas insolubles en HCL (%)
<i>Plantago psyllium</i> L (Semillas)	14%	4%	-----
<i>Trigonella foenum-graecum</i> L (Semillas)	12%	5%	-----
<i>P. ispaghula</i> Roxb (Semillas)	15%	1,8%	-----
<i>Eletraria Cardomomun</i> Maton (L.) (semillas)	-----	6%	3,5%
<i>Atropa belladonna</i> L (Hojas y fruto)	-----	16%	4%
<i>Rhamnus purshianus</i> D. C y A. Gray ex J. C. (Cáscara) (Corteza)	10%	7%	-----
<i>Hyoscyamus niger</i> L (Hojas y flores)	-----	30%	12%
<i>Eucalyptus globulus</i> L (Hojas)	10%	6%	-----
<i>Allium sativum</i> L (Bulbos)	7%	5%	-----
<i>Mucus vesiculosus</i> L (Tallos)	15%	24%	3%
<i>Digitalis purpurea</i> L (Hojas)	6%	12%	5%

ANEXO C: Técnica espectrofotométrica UV-VIS.

Tabla C.1. Valores de absorbancia obtenidos al variar la temperatura en la técnica Espectrofotométrica UV-VIS.

Temperatura (°C)	X ± SD
30	0,38 ± 0.050
40	0,56 ± 0.042
50	0,64 ± 0.100
60	0,63 ± 0.083
70	0,58 ± 0.076
80	0,45 ± 0.058

Tabla C.2. Valores de absorbancia obtenidos al variar el tiempo de calentamiento a las temperaturas estudiadas en la técnica Espectrofotométrica UV-VIS.

Tiempo (Mint.)	T= 40(°C)	T= 50(°C)	T= 60(°C)	T=70(°C)
10	0,09	0,28	0,26	0,12
20	0,10	0,28	0,40	0,43
30	0,12	0,29	0,52	0,37
40	0,21	0,35	0,48	0,33
50	0,19	0,30	0,44	0,39
60	0,20	0,30	0,44	0,39

Tabla C.3. Valores de absorbancia obtenidos al aumentar el tiempo de lectura. (Realizado a 60°C, 30 minutos de calentamiento).

Tiempo (mint.)/Rep	Réplicas					Media	Desv. Standard
	1	2	3	4	5		
1	0,55	0,57	0,54	0,51	0,51	0,53	0,02
5	0,56	0,57	0,54	0,51	0,50	0,53	0,03
15	0,53	0,48	0,47	0,49	0,46	0,47	0,01
20	0,46	0,45	0,45	0,46	0,45	0,45	0,07
25	0,45	0,43	0,42	0,43	0,44	0,43	0,01
30	0,39	0,35	0,39	0,38	0,39	0,38	0,01
35	0,35	0,36	0,36	0,39	0,32	0,36	0,03
40	0,34	0,35	0,32	0,33	0,31	0,33	0,02
45	0,24	0,27	0,27	0,25	0,25	0,27	0,01
50	0,21	0,20	0,21	0,23	0,21	0,21	0,08

Tabla C.4. Matriz del diseño factorial para la definición de condiciones óptimas de la reacción de Ninhidrina.

Nº Combinaciones	X₁ (Temperatura) (°C)	X₂ (Tiempo de Calentamiento) (min.)	X₃ (Tiempo de Lectura) (min.)	Respuesta (Absorbancia)
1	60	10	5	0,41
2	60	40	5	0,52
3	40	10	5	0,11
4	40	10	15	0,08
5	40	40	15	0,17
6	60	40	15	0,42
7	40	40	5	0,29
8	60	10	15	0,38
9	60	10	5	0,42
10	60	40	5	0,53
11	40	10	5	0,13
12	40	10	15	0,08
13	40	40	15	0,15
14	60	40	15	0,51
15	40	40	5	0,23
16	60	10	15	0,46

Tabla C.5. Resultados del diseño de experimentos aplicado para la búsqueda de condiciones.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F	Valor de P
A: Temperatura	0,14	1	0,3630	341,60	0,0000
B: Tiempo de calentamiento	0.000056	1	0.0350	33,09	0.0004
C: Tiempo de lectura	0.005	1	0.0090	8,95	0.0170
AB	0.001	1	0.0010	0,99	0.3400
AC	0.002	1	0.0010	1,70	0.2200
BC	0.004	1	0.0030	3,68	0.0900
Grupo	0.004	1	0.0005	0.99	0.3400
Total del error	0.00105	8	0.0001	-	-
<i>R-cuadrado = 97,99 %</i> <i>Standard Error of Est. = 0,03</i> <i>Mean absolute error = 0,018</i> <i>Durbin-Watson statistic = 3,33</i>					
ECUACIÓN AJUSTADA DEL MODELO					
Absorbancia = $-0,53 + 0,015 \cdot \text{Temperatura} + 0,007 \cdot \text{tiempo de calentamiento} - 0,0073 \cdot \text{tiempo de lectura} - 0,000054 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{tiempo de calentamiento} + 0,00015 \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{tiempo de lectura} - 0,00014 \cdot \text{tiempo de calentamiento} \cdot \text{tiempo de lectura}$.					
OPTIMIZACIÓN					
Valor óptimo de absorbancia = 0.446					
Factor	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel óptimo		
Temperatura (°C)	40	60	60 °C		
Tiempo de calentamiento (min.)	10	40	40 min.		
Tiempo de lectura (min.)	5	15	10 min.		

Tabla C.6. Resultados de los criterios estadísticos utilizados para evaluar la linealidad en la técnica espectrofotométrica.

Concentración del patrón (ppm)	Valores de absorbancia			Ecuación de la recta	
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
20	0,17	0,18	0,16	Y = 0,0093 X - 0,012	
40	0,35	0,37	0,36		
60	0,57	0,56	0,56		
80	0,77	0,76	0,75		
100	0,99	0,98	0,96		
Estadística de la regresión					
Coeficiente de correlación múltiple	R ² ajustado	Error típico	Sy	C.V.F (%)	Sbrel %
0,99	0,99	0,02	0,30	3,97	0,03
Análisis de varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1,034	1,034	4033	1,35E-17
Residuos	13	0,003	0,0002		
Total	14	1,037			
	Coeficientes	Error típico	Estadígrafo t	Probabilidad	Coeficiente de calidad (%)
Intercepción	-0,013	0,0096	-1,31	0,21	9,33E-07
Pendiente	0,0092	0,0001	63,50	1,35E-17	
Criterios establecidos:					
r _i : Coeficiente de correlación (r _i ≥ 0,99)					
C.V.F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas (C.V.F ≤ 5%)					
Sbrel %: Desviación estándar relativa de la pendiente. (Sbrel % ≤ 2%)					
Error típico de la regresión (0 ≤ Error típico ≤ Sy (Sy desviación Standard de Y)					
CC: Coeficiente de calidad (CC < 2,5%)					

Tabla C.7. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro precisión en la técnica espectrofotométrica.

REPETIBILIDAD						
Réplica 1	Réplica 2	Parámetros estadísticos				
0,45	0,45					
0,44	0,45	Media	0,45			
0,44	0,44	SD	0,006			
0,45	0,44	CV(%)	1,44			
0,45	0,45					
0,44	0,45					
PRECISIÓN INTERMEDIA						
Día 1 (Analista 1)	Día 2 (Analista 1)	Día 1 (Analista 2)	Día 2 (Analista 2)			
0,46	0,45	0,45	0,44			
0,44	0,41	0,45	0,44	Media	0,445	
0,44	0,44	0,44	0,44	SD =	0,009	
0,45	0,44	0,44	0,44	CV(%) =	2,10	
0,47	0,44	0,43	0,45	Horwitz =	4,52	
0,42	0,45	0,45	0,46			
Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9,78E-05	3	3,26E-05	0,34	0,80	3,1
Dentro de los grupos	0,002	20	9,58E-05			
Total	0,002	23				
Dentro de los Grupos S =0,010% ; CV(%) =2,20						
Entre los Grupos S = 0,004% ; CV(%) = 0,94						
Cochrans (C calculada) 0,57 Cochrans (C crítica) 0,59						
Horwitz 4.52						

Tabla C.8. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro exactitud en la técnica espectrofotométrica.

Conc. Teórica (ppm)	X (valores de Conc., ppm)	Media	Desv. Standard	R(%)=(X después –X antes) /X adicionada*100
Muestra (10 µL)	10,88	10,25	0,55	
	10,00			
	9,87			
10 + 30 ppm	39,56	39,83	0,23	97,73
	40,02			99,24
	39,89			98,81
10 + 60 ppm	72,04	71,65	0,68	102,99
	70,86			101,02
	72,04			102,99
10 + 75 ppm	86,45	86,09	0,44	101,60
	85,59			100,45
	86,23			101,31
Análisis estadístico de la Recuperación				
Estadística descriptiva		Prueba t		
Media	100,68	Media	100,68	
Desv.Standard	1,81	Varianza	3,29	
CV(%)	1,80	Observaciones	9	
		Grados de libertad	8	
		Estadígrafo t	1,12	
		P(T<=t) una cola	0,14	
		Valor crítico de t (una cola)	1,86	

Tabla C.9. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro sensibilidad en la técnica espectrofotométrica.

Resp. Blanco (Absorbancia)	Media	Desv Standard	Pendiente	Limite de detección (LD) (ppm)	Limite de cuantificación (LC) (ppm)
0,10	0,099	0,010	0,009	3,58	10,85
0,09					
0,10					
0,09					
0,12					
0,10					
0,11					
0,10					
0,09					
0,09					

Tabla C.10. Resultados obtenidos al aplicar el método de Bowker para determinar el límite de especificación en el ensayo cuantitativo (técnica espectrofotométrica)

% de aminoácidos	Resultados de los parámetros estadísticos		
0,77	Media (X): 0.78 Desv.Standard(S): 0,02	K = 4.33 a = 0,85 b = 6,33 c = 1.10	LIE (Límite inferior) LIE = X - KS LIE = 0.69
0,76			
0,77			
0,79			
0,76			
0,77			
0,79			
0,82			
0,77			
0,77			
0,77			

ANEXO D: Propuesta de monografía

PROPUESTA DE MONOGRAFÍA

Semillas de *Cucurbita*, polvo.

DEFINICIÓN

El polvo de *Cucurbita moschata* Duch, es preparado a partir de las semillas de esta planta, después de ser sometidas a procesos de desgrase, molinado y tamizado. El polvo contiene no menos de 0,79% de aminoácidos, expresado en base al contenido de Asparagina

CARACTERÍSTICAS

Polvo amarillo pardusco, con un ligero olor aceitoso, muy característico. Sus características y microscópicas aparecen descritas en la prueba de identificación A.

IDENTIFICACIÓN

A. Análisis Microscópico: Al examinar al microscopio, utilizando *disolución de hidrato de cloral R*, el polvo presenta los elementos siguientes: Parénquima lignificado y gránulos de almidón en forma anisotrópica (examinado con luz polarizada).

B. Reacción de Foling: Se pesan 50 mg del polvo se adiciona 2mL de agua y 0,5mL de una solución del reactivo de Foling (en agua en la proporción 1:3), se adiciona 2,5 mL de NaOH 0,5 M. Un ensayo positivo estará indicado por la aparición de una coloración azul intensa.

C. Reacción con ninhidrina: Se pesan 50 mg del polvo se adiciona 2mL de agua y 0,5mL de solución de ninhidrina (ninhidrina al 0,5%, disuelta en una mezcla acetona: agua: ácido acético (80:18:2) y se calienta en baño de María hasta la aparición de un color azul violáceo.

D. Cromatografía en capa Delgada

La CCD, en este caso, tiene como objetivo detectar las sustancias, presentes en la muestra, que reaccionan con la Ninhidrina, especialmente los aminoácidos que no forman el *Complejo RP* con este reactivo.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Fase estacionaria: Placa de gel de sílice GF para cromatografía en capa fina.(20x10cm), Merck.

Fase móvil: Metanol-Cloroformo-Amoníaco al 25%-Ácido Acético Glacial (80:10:8,5:1,5).

PROCEDIMIENTOS:

Muestra problema: Disolver 1,0 g del polvo en 40,0 mL de agua, agitar durante 30 minutos a 50°C, centrifugar durante 30 minutos y colectar el sobrenadante. Repetir el procedimiento, añadiendo por la segunda extracción 20,0 mL de agua al extracto residuo, juntar los sobrenadantes y añadir 20,0 mL de

metanol, colocar en refrigeración por 12 horas, centrifugar de nuevo 30 minutos para eliminar las proteínas, filtrar. Rotoevaporar el solvente y redissolver en 2,0 mL de una mezcla Metanol: Agua (1:1) y filtrar.

Muestras referencias: Disolver 10,0 mg de asparagina y prolina en 2,0 mL de Metanol: Agua (1:1).

Aplicación: 4,0 µL para muestras referencias y muestra problema.

Desarrollo: Aplicar por separado a la placa 2,0 µL de muestra problema y 4,0 µL de cada disolución de muestras de referencia. Dejar secar la placa al aire. Desarrollar hasta una distancia de 10,0 centímetros

Secado: Al aire durante 15 minutos.

Detección: Asperjar con la disolución de Ninhidrina al 2%, disuelta en una mezcla Acetona: Agua: Ácido Acético (80:18:2), Calentar de 40 °C a 60 °C durante 5 minutos.

Resultados: El cromatograma obtenido al aplicar la muestra describe la aparición de cinco manchas con valores de Rf = 0.23, 0.35, 0.48, 0.58, y 0.75. Las manchas con Rf = 0.35, 0.48 coinciden con las manchas de asparagina, y prolina como sustancias de referencia. La mancha con Rf = 0,23 (color café) corresponde a la Cucurbitina.

ENSAYOS ESPECIFICOS

Cenizas Totales. El contenido de cenizas totales no es superior al 6,0 por ciento, determinada en 1 gr.

Cenizas insolubles en ácido Clorhídrico. El contenido en cenizas insolubles en ácido sulfúrico no es superior al 3 por ciento, determinada en 1 g.

Pérdida por desecación. No más del 7,0 por ciento, determinada en 0,5 g de la droga por desecación en estufa a 100 -105 °C durante 2 horas..

VALORACIÓN

Muestra problema: Se pesan 2 g. del polvo, se añaden 20 mL de agua destilada y se agita durante 30 minutos a 50 °C. Se centrifuga a 6000 r.p.m durante 30 minutos y se separa el sobrenadante. Se repite el procedimiento y se juntan los sobrenadantes. Se añade 40 mL de metanol y se mantiene en refrigeración durante 12 horas. Se centrifuga a 6000 r.p.m durante 15 minutos y se separa el sobrenadante. Se rotoevapora a sequedad y se redissuelve el residuo en 2 mL de metanol: agua (1:1)

Muestra referencia: Diluir 10 mg de asparagina en una mezcla metanol: agua (1:1) hasta completar 10 mL.

Derivatización de la muestra patrón: Se toman 120 µL de la solución patrón, se le adiciona 0,5 mL de ninhidrina (Solución preparada al 0,5% en una mezcla de acetona: agua: ácido acético (80:18:2), se calienta a 60 °C por 40 minutos y se enrasa a 2 mL con solución metanol: agua (1:1)

Derivatización de la muestra problema: Se toman 25 µL de la muestra disuelta en metanol: agua (1:1) y de la muestra referencia (b), se adiciona 0,5 mL de ninhidrina, se calienta a 60 °C por 40 minutos y se enrasa a 2 mL en volumétrico de 2mL, con solución metanol: agua (1:1)

Método operativo: Se midió la absorbancia de la muestra por comparación con la disolución de referencia a 320 nm, frente a la solución de Ninhidrina como blanco, realizándose la lectura durante los primeros 10 minutos después de detenida la reacción. Se calcula el contenido (en %) de aminoácidos, calculado en base a asparagina, a partir de la siguiente ecuación:

$$C(\%) = \frac{A_M \cdot 1.72}{M_M}$$

Donde:

C: Concentración de aminoácidos en el polvo, en base a asparagina, expresado en %.

A_M: Absorbancia de la muestra problema

M_M: Masa de la muestra problema, g.

CONSERVACIÓN

En envase hermético.

ANEXO E: Comparación de los polvos.

Tabla E.1. Resultados obtenidos al aplicar los ensayos cuantitativos descritos en la monografía a los polvos obtenidos por los métodos evaluados (Polvo I y II).

Pérdida por desecación (%)		Cenizas totales (%)		Cenizas insolubles (%)		Contenido de aminoácidos (%)	
Polvo I	Polvo II	Polvo I	Polvo II	Polvo I	Polvo II	Polvo I	Polvo II
6,21	6,55	5,42	5,75	2,75	3,03	0,45	0,76
6,17	6,35	5,84	4,76	1,65	2,02	0,43	0,89
6,22	6,36	5,35	5,77	2,36	2,38	0,39	0,81
6,27	6,45	5,38	5,83	2,88	2,70	0,42	0,79
6,42	6,22	5,52	5,98	2,12	2,53	0,38	0,82
6,39	6,28	5,28	5,76	2,98	2,41	0,41	0,82
6,23	6,34	5,46	5,79	2,16	3,74	0,42	0,79
6,36	6,25	5,55	5,74	2,45	2,45	0,45	0,76
6,09	6,26	5,47	5,73	1,82	2,34	0,39	0,77
6,28	6,27	5,27	5,70	2,78	3,03	0,38	0,78
6.26 ± 0.01	6.33 ± 0.01	5.45 ± 0.2	5.58 ± 0.1	2.39 ± 0.2	2.66 ± 0.2	0.41 ± 0.0007	0.79 ± 0.02
t = 1,50 p=0,07		t = 0,96 p=0,17		t = 1,26 p=0,11		t = 25,92 p=8,4*E-15	

ANEXO F: Técnica volumétrica

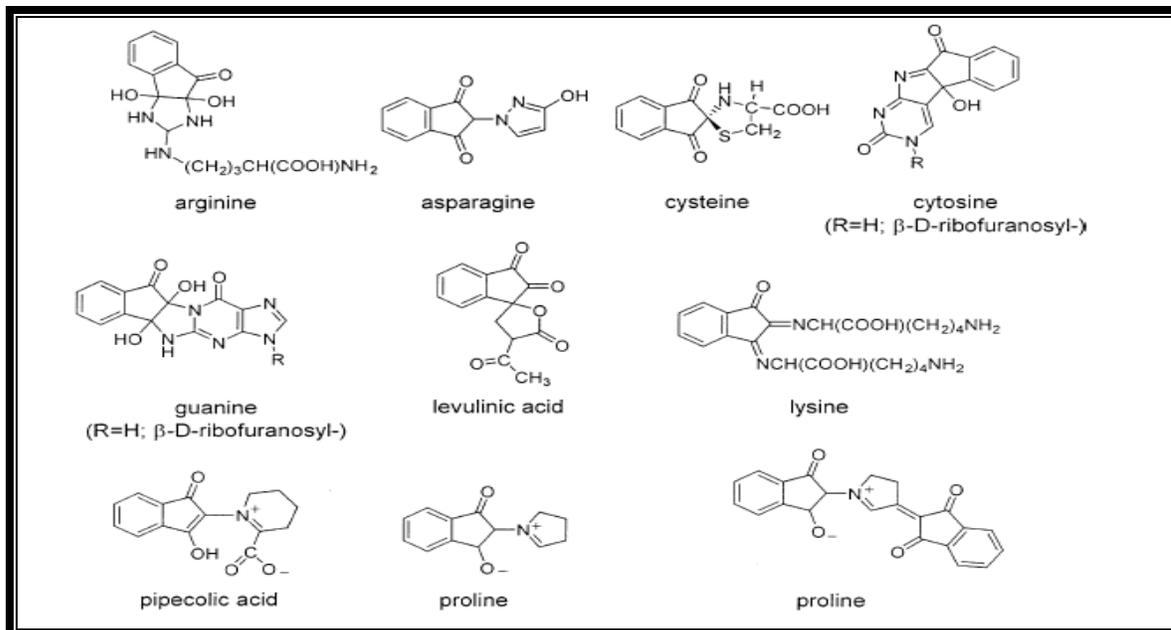
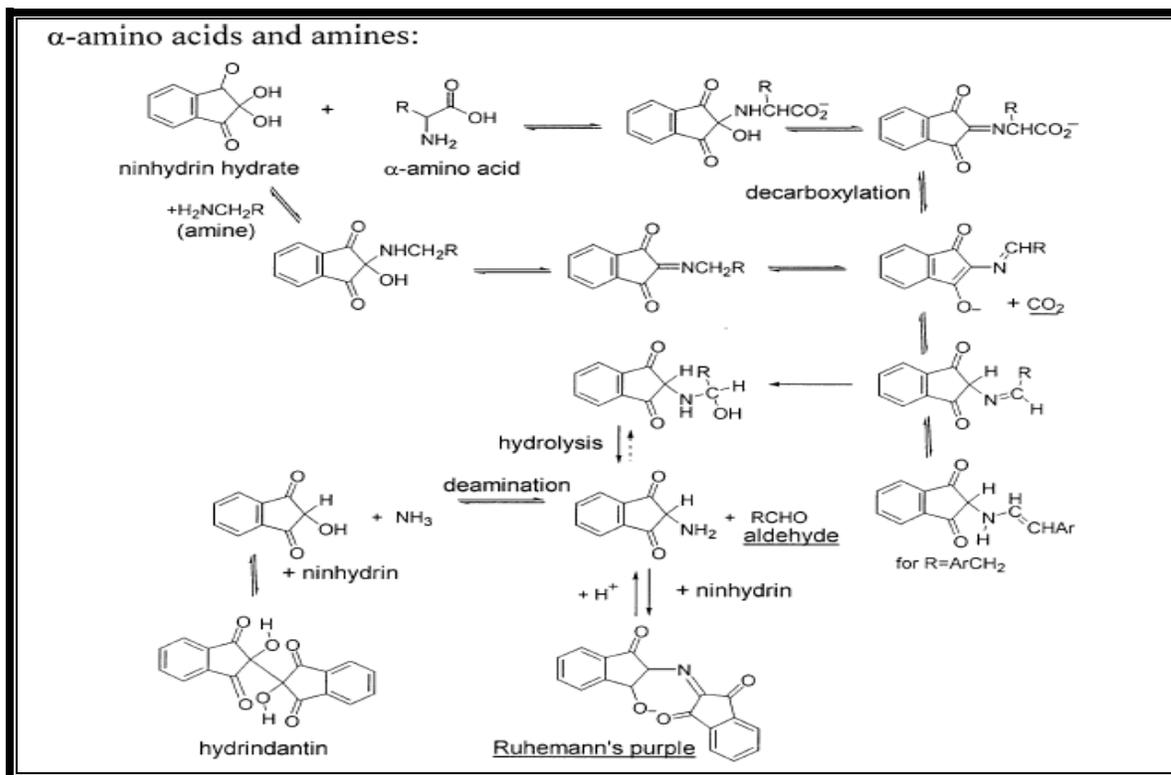
Tabla F.1. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar la linealidad en la Técnica Volumétrica.

Concentración del Patrón(mg/mL)	Curva 1	Curva 2	Tratamiento Estadístico			
			r_i	C.V.F (%)	Sbre %	Error típico
1	3,8	3,5	0,99	4,37	0,35	0,6
2	7,8	7,3				
3	11,3	11,5				
4	15,5	15,8				
5	19,3	19,6				
Estadísticas de la regresión						
ri. Coeficiente de correlación múltiple					(Criterio ≥ 0.9900)	
C.V.F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas					(Criterio $<5\%$)	
Sbrel %: Desviación estándar relativa de la pendiente					(Criterio $<2\%$)	
Error típico (Et) Desviación Standard de Y (Sy)					Criterio Et $< Sy$	
a \pm tSa y b \pm tSb Límites de confianza del intercepto y de la pendiente respectivamente					(Criterio: Para <u>a</u> Contener el cero y para <u>b</u> no contenerlo)	
Análisis de varianza para evaluar el parámetro linealidad en la técnica volumétrica						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	263,54	263,5	731,54	3,76E-09	
Residuos	8	2,88	0,36			
Total	9	266,42				
	Coeficientes	Error típico	Estadígrafo t	Probabilidad		
Intercepción	0,31	0,44	0,69	0,50		
Pendiente	3,63	0,13	27,04	3,76E-09		
Coeficiente de Calidad (CC)						
$\Sigma(Y_i - Y)/Y$	Grados de libertad (n-1)	Coeficiente de calidad (CC)		Criterio		
0	9	0		CC $< 2.5\%$		

Tabla F.2. Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y precisión intermedia de la técnica Volumétrica

REPETIBILIDAD					
Volumen consumido		Parámetros estadísticos			
11,3					
11,5		Media	11,41		
11,5		SD	0,09		
11,4		CV(%)	0,86		
11,3					
11,5					
Día 1 (Analista 1)	Día 2 (Analista 1)	Día1 (Analista 2)	Día 2 (Analista 2)	Estadística descriptiva	
11,3	11,5	11,7	11,4	Media = 11,28 s = 0,21 CV (%) = 1,89 Horwitz = 2,78	
11,2	11,0	11,0	11,5		
11,0	11,3	11,3	11,4		
11,5	11,0	11,4	11,0		
11,5	11,5	11,0	11,3		
11,4	11,0	11,3	11,4		
ANÁLISIS DE VARIANZA					
Estadística descriptiva					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Columna 1	6	67,89	11,32	0,04	
Columna 2	6	67,3	11,22	0,06	
Columna 3	6	67,7	11,28	0,07	
Columna 4	6	68	11,33	0,03	
Resumen					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	0,05	3	0,016	0,32	0,81
Dentro de los grupos	1,0007	20	0,050		
Total	1,05	23			
Cochrans:	0,36				
Dentro de los días: S = 0,126 ; CV (%) = 1,113					
Entre días: s = 0,091; CV(%) = 0,81					
Cochrans: C_{Cal} 0,363850919 C_{Crit} 0,7					

ANEXO G: Reacción de ninhidrina



Anexo G. Mecanismo de reacción de la reacción de Ninhidrina con α -aminoácidos para formar el complejo Ruhemann's purple (RP) y derivados con aa que no forman el complejo. (Friedman M, 2004).

ANEXO H: Técnica de HPLC

Tabla H.1. Resultados de los criterios estadísticos obtenidos al evaluar la linealidad en la técnica de Cromatografía líquida de Alta resolución.

Concentración del patrón ($\mu\text{g/mL}$)	Valores del área			Ecuación de la recta	
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
25	156	161	156	$Y = 7.8173X - 31.5$	
50	386	381	365		
75	564	549	532		
100	722	745	736		
125	944	952	973		
Estadística de la regresión					
Coefficiente de correlación múltiple	R^2 ajustado	Error típico	C.V.F (%)	Sbrel %	$a \pm tSa$
0,99	0,99	0,22	5.02	0,37	-28,23 + 34,97
Análisis de varianza					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	18688,04	18688,04	3921,20	1,62E-17
Residuos	13	61,95	4,76		
Total	14	18750			
Intercepto					
	Coefficientes	Error típico	Estadígrafo t	Probabilidad	Coefficiente de calidad (%)
Intercepción	0,31	1,26	3,38	0,005	9,34E-07
Variable X 1	0,13	0,002	62,62	1,62E-17	
Criterios establecidos: r_i : Coeficiente de correlación $r_i \geq 0,99$; C.V.F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas $C.V.F \leq 5\%$ Sbrel %: Desviación estándar relativa de la pendiente. $Sbrel \% \leq 2\%$ $b \pm tSb$: Límites de confianza del intercepto (Incluir el cero) Error típico ($0 \leq \text{error típico} \leq S_y$ (S_y desviación Standard de Y) CC: Coeficiente de Calidad ($CC < 2,5\%$)					

Tabla H.2. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro precisión en la técnica de Cromatografía líquida de Alta resolución

REPETIBILIDAD						
Réplica 1	Réplica 2	Parámetros estadísticos				
552	551	Media	538,750			
545	519	S =	4,535			
540	534	CV(%) =	0,84			
545	543					
550	552					
526	538					
PRECISIÓN INTERMEDIA						
Día 1	Día 2	Día 3	Estadística descriptiva			
542	536	536				
545	536	534	Media	539,389		
534	548	532	S =	4,889		
545	541	541	CV(%) =	0,91		
540	546	545	Horwitz =	1,55		
536	536	536				
Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	6	3242	540,33	21,06		
Columna 2	6	3241	540,17	24,17		
Columna 3	6	3234	539	18,4		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6,33	2	3,17	0,15	0,86	3,68
Dentro de los grupos	318,17	15	21,21			
Dentro de los Grupos S =4,60% ; CV(%) =0,85						
Entre los Grupos S = 4.60 % ; CV(%) = 0.91%						
Cochrans (C calculada) 0,33 Cochrans (C crítica) 0,59						
CV(%) Horwitz = 1,55						

Tabla H.3. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro sensibilidad en la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Resp. Blanco (Area)	Media	Desv Standard	Pendiente	Limite de detección (LD)	Limite de cuantificación (LC)
40	31,6	11,80	7,81	4,98	15,08
31					
19					
46					
14					
41					
45					
26					
18					
36					

ANEXO I: Ensayos físico químicos.

Tabla 1.1. Porcentaje de polvo obtenido en cada tamiz

Tamices (mcm)	425	355	300	250	212	180	150	125	106	090	075	Colector
% de polvo	4	6	7	11	15	18	13	9	7	5	3	2

Tabla 1.2. Resultados obtenidos durante el estudio de higroscopicidad según el método de Callagan.

Porcentaje Humedad Residual	Peso Inicial (Pi) (g)	Peso Final (Pf) (g)	Pf-Pi (g)	% de incremento	Porcentaje (base seca)	Contenido de Humedad de equilibrio (CHE) (%)
8,5	0,9947	0,9758	-0,0189	-1,14	-1,05	-1,07
18,8	0,998	0,9854	-0,0126	-0,84	-0,78	-0,79
37,1	0,9936	0,9861	-0,0075	-0,51	-0,47	-0,48
47,2	1,0034	0,9975	-0,0059	-0,39	-0,37	-0,37
58,3	1,0071	1,0115	0,0044	0,29	0,28	0,28
70,4	0,9997	1,0181	0,0184	1,24	1,15	1,14
80,5	1,0017	1,0255	0,0238	1,62	1,51	1,49
88,8	1,0133	1,0555	0,0422	2,62	2,44	2,38
93,9	1,0087	1,0549	0,0462	3,07	2,86	2,78
97,5	1,0027	1,086	0,0833	5,49	5,11	4,86

Tabla 1.3. Valores promedios de Rf obtenidos en las manchas de cada muestra de polvo, colocada en las condiciones de estudio.

Muestras colocadas a 5000 lx y 25°C							
Manchas	M1 (15 días)	M2(30 días)	M3(45 días)	M4(60 días)	M5(75 días)	M6(90 días)	Muestra inicial
Rf 1	0,23	0,27	0,21	0,23	0,26	0,25	0,24
Rf 2	0,35	0,42	0,32	0,37	0,45	0,40	0,38
Rf 3	0,47	0,53	0,45	0,48	0,55	0,51	0,50
Rf 4	0,58	0,62	0,53	0,6	0,63	0,6	0,61
Rf 5	0,75	0,73	0,68	0,73	0,78	0,73	0,74
Muestras colocadas a 60%HR y 30°C							
Rf 1	0,22	0,23	0,23	0,28	0,24	0,21	0,24
Rf 2	0,35	0,34	0,33	0,35	0,32	0,33	0,38
Rf 3	0,44	0,45	0,44	0,53	0,53	0,45	0,50
Rf 4	0,64	0,62	0,58	0,60	0,59	0,61	0,61
Rf 5	0,71	0,67	0,71	0,71	0,67	0,68	0,74
Muestras colocadas a 75%HR y 40°C							
Rf 1	0.19	0.21	0.24	0.24	0.22	0.19	0,24
Rf 2	0.36	0.38	0.36	0.33	0.32	0.33	0,38
Rf 3	0.48	0.46	0.52	0.48	0.47	0.51	0,50
Rf 4	0.56	0.59	0.58	0.59	0.61	0.59	0,61
Rf 5	0.71	0.74	0.72	0.74	0.72	0.73	0,74

Tabla 1.4. Resultados obtenidos durante el estudio de estabilidad inicial al polvo, usando la técnica de HPLC.

Tiempo	5000 lx y 25°C		HR=60% y 30 °C		HR=75% y 40 °C	
	Área	% de Cucurbitina	Área	% de Cucurbitina	Área	% de Cucurbitina
Inicial	512	0,54	525	0,56	506	0,54
15 días	492	0,52	509	0,54	478	0,51
30 días	498	0,53	469	0,50	465	0,49
45 días	492	0,52	484	0,52	470	0,50
60 días	486	0,52	495	0,53	466	0,50
75 días	462	0,49	502	0,54	442	0,47
90 días	486	0,52	496	0,53	446	0,48

ANEXO J: Evaluación del aceite

Tabla J.1. Valores obtenidos en la determinación de la Densidad, Índice de refracción y Rotación óptica del aceite.

Índice de Refracción		
Índice de refracción	X ± S	Intervalo de Confianza de la media
1,468; 1,467; 1,467; 1,467; 1,468	1,467 ± 0,0002	1,46 – 1,47
Densidad		
Densidad(g/cm³)	X ± S	Intervalo de Confianza de la media
0,915; 0,905; 0,915, 0,896; 0,92	0,91 ± 0,01	0,89 – 0,93
Rotación óptica		
Rotación óptica (°)	X ± S	Intervalo de Confianza de la media
0,34; 0,35; 0,33; 0,34; 0,35; 0,35	0,34 ± 0,01	0,30 – 0,38

Tabla J.2. Valores obtenidos en la determinación del límite superior de especificación del Índice de Saponificación del aceite.

Blanco (n2)	Muestra (n1)	Volumen consumido (mL)	Índice de Saponificación (Is)	X ± SD	LSE (Límite superior)
0,1	13,2	13,1	122,49	125,5 ± 2,02	128,23
0,1	13,8	13,7	128,09		
0,1	13,6	13,5	126,23		
0,1	13,5	13,4	125,29		
0,1	13,5	13,4	125,29		
0,1	13,5	13,4	125,29		
0,1	13,2	13,1	122,49		

Tabla J.3. Resultados obtenidos al realizar el ensayo Índice de acidez al aceite obtenido a partir las semillas de *Cucurbita moschata Duch*, por el método de compresión

No. del ensayo	Volumen consumido(mL)	Índice de Acidez (%)
1	2,6	0,73
2	2,6	0,73
3	2,6	0,73
4	2,7	0,76
5	3,0	0,84
6	2,9	0,81
7	2,8	0,78
8	2,8	0,78
9	2,6	0,73
10	2,7	0,76
11	2,6	0,73
12	2,7	0,76
13	2,6	0,73
14	2,6	0,73
15	2,7	0,76
16	3,0	0,84
17	2,9	0,81
18	2,6	0,73
19	2,8	0,78
20	3,0	0,84
21	2,6	0,73
22	2,7	0,76
23	2,8	0,79
24	2,6	0,73
25	2,9	0,81
Media (X): 0,77 Desv. Estándar(S): 0,04	K = 2,66 a = 0,89 b = 2,51 c = 0,71	LSE (Límite superior) LSE = X + KS LSE= 0,74 + 0,11 LSE = 0,87

Tabla J.4. Resultados obtenidos al realizar el ensayo Índice de peróxido al aceite obtenido a partir las semillas de Cucurbita moschata Duch, por el método de compresión.

No. del ensayo	Volumen consumido (mL)	Índice de peróxido (Ip)
1	0.8	2.24
2	0.7	1.96
3	0.6	1.68
4	0.7	1.96
5	0.5	1.40
6	0.6	1.68
7	0.7	1.96
8	0.6	1.40
9	0.9	2.52
10	0.8	2.24
11	0.7	1.96
12	0.5	1.40
13	0.5	1.40
14	0.9	2.52
15	0.5	1.40
16	0.7	1.96
17	0.6	1.68
18	0.9	2.52
19	0.6	1.68
20	0.7	2.52
21	0.6	1.68
22	0.6	1.68
23	0.5	1.40
24	0.7	1.96
25	0.8	2.24
Media (X): 1,85 Desv. Standard(S): 0,38	K = 2,66 a = 0,89 b = 2,50 c = 0,71	LSE (Límite superior) LSE = X + KS LSE= 1.85 + 1.01 LSE = 2,87

Tabla J.5. Valores de los ensayos fisicoquímicos, reportados en la Farmacopea Europea, 2002, para aceites vegetales vírgenes.

Parámetro/aceite	Densidad (g/cm ³)	Índice de Refracción	Rotación óptica (°)	Índice de Acidez	Índice de Peróxido	Absorbancia $\lambda_{\text{máx.}}$
Oliva	0,958	1,479	3,5 a 6,0	2,0	20	270 nm
Ricino	0,913	-	-	2,0	15	269 nm
Trigo	0,925	1,475	-	2,0	10	-
Almendras	0,916	-	-	2,0	15	232-270 nm