

Instituto de Farmacia y Alimentos
Universidad de La Habana

METODOLOGÍA PARA ESTUDIOS DE ESTABILIDAD QUÍMICA EN FORMULACIONES DE QUITINA

Yania Suárez Pérez,¹ Ivone Almirall Díaz,¹ Hilda María González San Miguel,² Ofelia Bilbao Revoredo² y Olga M. Nieto Acosta²

RESUMEN

Se propuso combinar la gravimetría directa como método cuantitativo con la espectroscopia infrarroja como técnica cualitativa complementaria, con el objetivo de establecer la metodología para el seguimiento de la estabilidad química de la quitina como fármaco en diferentes formas farmacéuticas: suspensión, crema, supositorio. La determinación del contenido de quitina por técnicas gravimétricas se validó en cada caso según los parámetros: linealidad, precisión, exactitud y especificidad. El análisis cuantitativo mostró resultados satisfactorios con respecto al contenido de fármaco en el tiempo en todas las formulaciones evaluadas. Estos resultados fueron corroborados por los espectros infrarrojos, manifestándose que la quitina es el único producto retenido en los filtros y que desde el punto de vista químico no ha sufrido alteraciones transcurridos 2 a de estudio.

Descriptores DeCS: QUITINA/química; ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS; ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA/métodos.

Los estudios de estabilidad por su importancia son considerados actualmente requisito indispensable para el registro y venta de medicamentos. De esta forma se garantiza la integridad de la formulación durante el lapso de tiempo donde ésta cumpla los fines para los cuales fue creada.¹

La quitina es un polímero de origen natural que posee actividad como acelerador de la cicatrización y reconstructor hístico.²⁻⁴ Su efecto farmacológico, unido a su carácter biocompatible y atóxico, han propiciado su introducción con éxito en diferentes formas farmacéuticas.

¹ Master en Tecnología y Control de Medicamentos.

² Doctor en Ciencias Farmacéuticas.

Por esta razón, se hace necesario establecer una metodología para evaluar el comportamiento químico de este fármaco. Los métodos químicos de determinación cuantitativa reportados en la bibliografía,⁵⁻⁸ constituyen técnicas indirectas de limitada confiabilidad para su utilización en la estimación del contenido de quitina, ya que se basan en la determinación de sus productos de hidrólisis química o enzimática.

La extremada estabilidad química de la quitina ha sido evaluada en el polvo obtenido en Cuba a partir de los desechos de la industria pesquera.⁹ Se reporta un tiempo de vencimiento superior a los 5 a, según estudios cinéticos realizados a la hidrólisis ácida del polímero (Nieto OM. Quitina. Su estudio y utilización como fármaco acelerador de la cicatrización. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, 1993).

En el presente trabajo nos proponemos evaluar la combinación de la gravimetría directa con la espectroscopia infrarroja (IR) en el seguimiento de la estabilidad química de la quitina en 3 formas farmacéuticas: suspensión, crema y supositorio.

MÉTODOS

Equipos

- Espectrofotómetro IR analítico PHILIPS PV 9600
- Bomba de vacío LABINET
- Balanza analítica ER-60 A
- Baño termostático ROTOMED BM-02
- Estufa MLW Aero-Steril

Reactivos

- Etanol 96 %, p.a
- Hidróxido de sodio, p.a
- Hidróxido de potasio, p.a
- Cloroformo, p.a

Preparación de las muestras

Se prepararon las muestras con solventes adecuados que garantizaron la separación de la quitina de los restantes componentes según la forma farmacéutica.

Suspensión: se tomaron 5 mL, se añadió una mezcla de etanol-agua-NaOH 20 % (10:15:40) y se calentó a temperatura de 50 °C en baño termostático con agitación.

Supositorios: se colocaron 3 supositorios en un balón de reflujo y se añadieron 100 mL de KOH/etanol 0,5 mol/L. Se introdujo el balón en un baño termostático ajustado a 100 °C y se reflujo durante 30 min con agitación a intervalos.

Crema: se pesaron con exactitud 3 g, se añadió una mezcla de etanol-cloroformo (10:5) y se calentó a temperatura de 60 ± 5 °C en un baño termostático con agitación constante.

Determinación gravimétrica del contenido de quitina

Las muestras de ensayo se filtraron en caliente por filtros Gooch aplicando vacío. Posteriormente se lavaron los residuos con soluciones calientes de solvente de forma sucesiva. Luego se secaron los residuos en la estufa ajustando a la temperatura apropiada en cada caso y se pesaron, repitiendo esta operación hasta lograr peso constante.

Validación de las técnicas gravimétricas para control de calidad

Las técnicas ensayadas para las diferentes formas terminadas, se validaron según los parámetros linealidad, precisión, exactitud y especificidad. Se consideraron los valores de 100 % de contenido de quitina. La determinación de la especificidad varió según la formulación, ya que fue necesario evaluar placebos de cada producto por el método propuesto y se verificó por pesadas la existencia o no de interferencias de las sustancias auxiliares. Las características de las técnicas gravimétricas diseñadas para el control de calidad de las 3 formas farmacéuticas evaluadas se resumen en la tabla 1.

Aplicación de espectrofotometría IR como técnica complementaria al análisis cuantitativo por gravimetría

Los residuos secos retenidos en los filtros Gooch después del análisis gravimétrico, se rasparon cuidadosamente. Para obtener los espectros IR se preparan dispersiones en bromuro de potasio. Estos espectros se compararon con el obtenido para la materia prima y con cada uno de

los espectros obtenidos en los diferentes tiempos en que se realiza el estudio.

Condiciones de los estudios de estabilidad química

Para cada forma farmacéutica estudiada se establecieron las condiciones de almacenamiento y envase que se describen en la tabla 2.

El seguimiento de la estabilidad química se realizó de forma cuantitativa por gravimetría directa y de forma cualitativa por espectroscopia IR. Las determinaciones se realizaron a tiempo cero, 3, 6 y 12 meses en todos los casos.

RESULTADOS

Los resultados de la validación de las técnicas gravimétricas se reflejan en la tabla 3. Estas técnicas resultaron válidas para cuantificar la quitina en cada forma farmacéutica, pues se cumplen los criterios de aceptación para los parámetros linealidad, exactitud y precisión.

La gravimetría resultó ser específica para control de calidad, ya que el análisis por triplicado de los placebos de cada producto dio los mismos pesos antes y después de aplicar el método analítico. De

TABLA 1. Características del lavado y temperatura de secado aplicadas en la determinación gravimétrica para forma farmacéutica

Forma farmacéutica	Características del lavado	Temperatura de secado
Suspensión	Dos fracciones de etanol-agua-NaOH 20 % Dos fracciones de etanol de 5 mL	80 ± 5 °C
Supositorio	Se arrastran las partículas de quitina con pequeñas porciones de agua destilada hasta completar 400 mL	105 ± 5 °C
Crema	Cuatro fracciones de etanol de 20 mL Dos fracciones de cloroformo de 5 mL Dos fracciones de etanol de 5 mL	80 ± 5 °C

TABLA 2. Temperatura de almacenamiento y tipo de envase utilizado en el estudio de estabilidad química de cada formulación

Forma terminada	Envase	Temperatura de almacenamiento
Suspensión	Frascos de vidrio ámbar por 120 mL (V)	Ambiente (A)
Supositorio	Tiras de aluminio termosellable por 7 supositorios (T)	Ambiente (A) Refrigeración 8-15 °C (R) Climatización 20 °C (C)
Crema	Frascos plásticos (P) Frascos de cristal ámbar por 200 g (CA)	Ambiente (A) Refrigeración 2-8 °C (R)

TABLA 3. Resultados de la validación de las técnicas gravimétricas diseñadas para control de la calidad de las formulaciones evaluadas

Forma terminada	Linealidad	Exactitud	Repetibilidad	Reproducibilidad
Suspensión	$r = 0,9998$ $r^2 = 0,9996$ $t_{exp} = 1,804$ $t_{teo} = 2,160$ $p = 0,000003$	$t_{exp} = 0,921$ $t_{teo} = 2,120$ $CV = 0,697 \%$ $R = 98,56 \%$	$CV_{80\%} = 0,87 \%$ $CV_{100\%} = 0,63 \%$ $CV_{120\%} = 0,53 \%$	$CV = 0,93 \%$
Supositorio	$r = 0,9994$ $r^2 = 0,9988$ $t_{exp} = 1,530$ $t_{teo} = 2,120$ $p = 0,000001$	$t_{exp} = 0,165$ $t_{teo} = 2,160$ $CV = 2,0 \%$ $R = 97,09 \%$	$CV_{80\%} = 1,2 \%$ $CV_{100\%} = 1,4 \%$ $CV_{120\%} = 0,5 \%$	$CV = 1,0 \%$
Crema	$r = 0,9999$ $r^2 = 0,9998$ $t_{exp} = 1,998$ $t_{teo} = 2,160$ $p = 0$	$t_{exp} = 2,358$ $t_{teo} = 2,360$ $CV = 0,2 \%$ $R = 98,03 \%$	$CV_{0\%} = 1,21 \%$ $CV_{00\%} = 1,04 \%$ $CV_{20\%} = 0,89 \%$	$CV = 0,99 \%$
Criterio de aceptación	$r^3 \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ $t_{exp} < t_{teo}$ $p << 0,5$	$t_{exp} < t_{teo}$ $CV \leq 3,0 \%$ $R = 97-103 \%$	$CV \leq 1,5 \%$	$CV \leq 3,0 \%$

esta forma se demuestra la no interferencia de las sustancias auxiliares de cada formulación.

En la figura se muestran los espectros IR obtenidos para cada forma terminada transcurridos 12 meses del estudio, después de procesar las muestras almacenadas a temperatura ambiente por gravimetría.

Como se observa en la figura, existió total coincidencia entre todos los espectros, por lo que al cabo de 1 a, fue quitina y no otra la sustancia que se retuvo por los filtros Gooch. Se mantuvieron en

localización e intensidad las bandas asignables a los grupos funcionales, lo cual evidencia que desde el punto de vista químico no ocurrió degradación del principio activo.

Al analizar los espectros IR obtenidos en todos los casos, podemos apreciar una banda ancha de mediana intensidad asignada al ν O-H, que aparece entre 3 280 y 3 440 cm^{-1} , seguidamente se observa una banda característica del ν N-H a los 3 120 cm^{-1} . En estado sólido las bandas N-H aparecen entre 3 330 y 3 060 cm^{-1} como bandas múltiples en dímeros cis y polí-

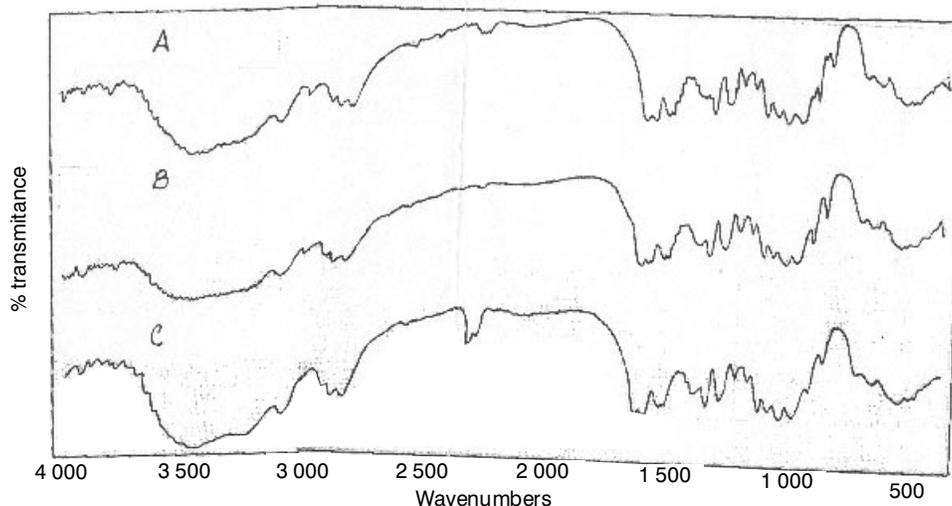


FIG. Espectros IR obtenidos a los 12 meses para cada forma farmacéutica: A: suspensión; B: crema; C: supositorio.

meros trans, el OH puede salir hasta $3\ 200\ \text{cm}^{-1}$.

En el rango de $1\ 880\text{-}2\ 960\ \text{cm}^{-1}$ aparecen bandas de mediana intensidad características del $\nu\ \text{C-H}$, simétrico y antisimétrico de grupos metílicos y metilénicos.

A los $1\ 640$, $1\ 555$ y $1\ 320\ \text{cm}^{-1}$ aparecen bandas asignadas a las vibraciones de amida III, II y I respectivamente. La primera correspondiente al $\nu\ \text{C=O}$, y las dos restantes pertenecientes al $\delta\ \text{N-H}$. Todas son bandas agudas de mediana intensidad. A continuación en el rango de $1\ 380\text{-}1\ 410\ \text{cm}^{-1}$ aparecen bandas agudas de mediana intensidad, atribuidas a la deformación de doblajes simétricos y antisimétricos de grupos metílicos y metilénicos, características del $\delta\ \text{C-H}$. Por último podemos observar bandas agudas débiles, pertenecientes al enlace $\beta(1\text{-}4)$, que aparecen entre 900 y $895\ \text{cm}^{-1}$.

Con el análisis cualitativo por espectroscopia IR se garantizó que los contenidos de principio activo reportados por gravimetría correspondieron

únicamente al fármaco, sin manifestarse interferencias de sustancias auxiliares o productos de degradación.

La limitada sensibilidad de la gravimetría pudo ser contrarrestada ya que se trabajó con una elevada cantidad de muestra, de modo que pudo disminuir significativamente el error por pesada.

Finalmente, la tabla 4 brinda los resultados de la cuantificación de la quitina en el tiempo al aplicar la técnica gravimétrica adaptada para cada forma farmacéutica. Los valores son la media de 3 determinaciones y provienen de un mismo lote.

Cuando analizamos los resultados de la cuantificación de la quitina en el tiempo por gravimetría directa durante los 12 meses estudiados, pudo apreciarse que la variación del contenido de quitina fue muy pequeña y no se observaron diferencias con respecto a los diferentes envases y temperaturas de almacenamiento. Todos los valores se encontraron en el rango de $90\text{-}110\ \%$, por lo que los productos se conservaron químicamente estables.

TABLA 4. Resultados de la cuantificación de quitina en las 3 formulaciones evaluadas en el estudio de estabilidad

Forma farmacéutica	Envase	Temperatura	Tiempo 0	Contenido de quitina (%)		
				3 meses	X ± DE 6 meses	1 a
Suspensión	V	A	96,69±0,56	96,12±0,47	96,42±0,89	96,01±0,38
Crema	CA	A	106,40±0,6	100,19±1,0	106,24±1,2	104,80±1,6
		R	103,10±0,9	104,91±0,9	103,71±0,5	102,60±1,0
Crema	P	A	102,30±0,8	101,95±0,9	106,04±1,0	104,34±0,9
		R	102,93±1,0	104,46±0,9	103,15±1,0	100,66±1,2
Supositorio	T	A	96,34±1,15	96,40±0,73	96,29±0,78	96,05±0,64
		C	96,76±1,68	96,45±0,88	96,29±1,39	96,20±2,05
		R	96,69±0,99	96,40±1,12	96,33±1,54	96,30±1,79

V: frascos de vidrio ámbar por 120 mL; CA: frascos de cristal ámbar por 200 g; P: frascos plásticos; T: tiras de aluminio termosellable por 7 supositorios; A: ambiente; R: refrigeración; C: climatización.

DISCUSIÓN

El tratamiento aplicado a cada muestra permitió eliminar las posibles interferencias debidas a los excipientes. La disolución de las sustancias auxiliares con solvente apropiado, acompañado de calentamiento y agitación, posibilitó la separación de la quitina por filtración, por lo que se logró adecuada especificidad.

Solamente en el caso de los supositorios este paso requirió de la saponificación previa del excipiente oleoso, para garantizar su total eliminación sin necesidad de consumir volúmenes tan elevados de solvente orgánico apolar que encarecería la técnica analítica.

Se alcanzó en las 3 técnicas diseñadas, una elevada linealidad entre el 80-120 %, según mostraron los coeficientes de correlación (r) y de determinación (r²). Para los interceptos las pruebas de la t de Student experimentales fueron inferiores a las teóricas para el 95 % de confianza, por lo que no resultaron significativamente diferentes de cero. Por otra parte, las pendientes fueron significativas con t de Student muy altas y valores de probabilidad (p) para la hipótesis nula de la pendiente muy por debajo del 0,05 establecido como

límite, por lo que el valor observado fue prácticamente igual al predicho.

La evaluación de la exactitud reflejó el error sistemático, que para este método a pesar de requerir un alto grado de manipulación, dio valores de coeficientes de variación (CV) y de recobrado medio (R) dentro del rango establecido y se alcanzó gran correlación lineal entre los miligramos recuperados y los añadidos de principio activo.

Para la precisión, al igual que en los parámetros anteriores, se cumplieron los criterios de aceptación reportados en la literatura para la repetibilidad y la reproducibilidad, por lo que los errores aleatorios no repercutieron apreciablemente en el método propuesto.

A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos en la evaluación de la especificidad de esta técnica gravimétrica, es conocido que la gravimetría como método, carece de la especificidad y sensibilidad requerida para el seguimiento de la estabilidad de este principio activo. La quitina es un producto de elevada estabilidad química y térmica, que rinde por hidrólisis ácida o enzimática: quitosana, N-acetil glucosamina, D-glucosamina y ácido acético, cuando este proceso transcurre totalmente.

Las condiciones para que se realice una hidrólisis total son extremadamente drásticas. No obstante, de los productos obtenidos sólo la quitosana presenta limitada solubilidad, ya que el resto son compuestos altamente solubles que pueden ser eliminados con lavados que empleen soluciones hidroalcohólicas.

En cada una de las técnicas evaluadas pudiera interferir la quitosana en la pesada del residuo por su insolubilidad en las

soluciones de lavado. Por esta razón, el seguimiento de la estabilidad por gravimetría se complementó con la espectroscopia IR. De este modo pudimos descartar la presencia de quitosana por comparación de las bandas características de los espectros obtenidos durante el estudio con los espectros de la materia prima y de los productos procesados por gravimetría cuando estaban recién elaborados.

SUMMARY

We proposed to combine direct gravimetry as a quantitative method with infrared spectrophotometry as a supplementary qualitative technique so as to establish a methodology for monitoring chemical stability of chitin as a drug in various pharmaceutical forms: suspension, cream and suppository. The determination of chitin by gravimetric techniques was validated in every case according to linearity, precision, accuracy and specificity parameters. The qualitative analyses showed satisfactory results in the drug contents in time in all the evaluated formulations. These outcomes were corroborated by infrared spectra, which showed that chitin is the only product left in filters and that it has not changed from the clinical viewpoint after two year of study.

Subject headings: CHITIN/chemistry; DRUG STABILITY; SPECTROPHOMETRY, INFRARED/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Valdés Santurio JR. La estabilidad de los productos farmacéuticos. IMEFA 1988;4(5):1-16.
2. Balassa L, Prudden J. Applications of chitin and chitosan in wound healing acceleration. Proc. of the Int. Conf. on chitin/chitosan, Muzzarelli and Pariser, Italy. 1984:296-305.
3. Camero LJ, Socorro B, Montes A. Utilization of chitin in the cicatrization of cutaneous burns. Rev Cub Univ Central Venez 1994;57(1):12-6.
4. Henriques RD, Nieto OM, Bilbao O, Fernández S. Bioopharmaceutical and clinical evaluation of chitin. J Hungarian Pharm Soc Gyogay 1988;32(9):493.
5. Paszkiewicz G, Niedzwicka J, Popowicz J. Potentiometric determination of chitin. Chem Anal (Warsaw) 1971;16(2):443-4.
6. López de Alba PL, López-Martínez L, Guzman M. Determinación espectrofotométrica de la pureza de la quitosana mediante reacción con ninhidrina. An Quim 1990;86(7):801-4.
7. Agullo E, Jeanneret B, Sadi S, Popovich L. Determinación polarográfica de quitina y quitosana. An Asoc Quim Argent 1988;76(5):347-54.
8. Holan Z, Votubra J, Vlasakova V. New method of chitin determination based on deacetylation and gas-liquid chromatographic assay of liberated acetic acid. J Chromatogr 1991;190(2):67-76.
9. Henriques RD, Nieto OM. Método para obtención de quitina suficientemente pura. Patente cubana No. 20760, 1980.

Recibido: 2 de septiembre de 1999. Aprobado: 14 de octubre de 1999.

M. Yanía Suárez Pérez. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ave 23 No. 21422 entre 214 y 222, La Coronela, municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.