

## Productos naturales

Laboratorio "Roberto Escudero Díaz"

### Desarrollo y validación de un nuevo método para estimar la deshomogenización de quitina en supositorios

Oscar García Pulpeiro<sup>1</sup> y Yania Suárez Pérez<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Se trató por primera vez el desarrollo de un método alternativo sencillo para determinar la deshomogenización de quitina en supositorios rectales. El método propuesto se basa en la determinación de la deshomogenización a partir de la relación de la densidad de quitina presente en la punta y en la base del supositorio. Para el cálculo de la densidad por desplazamiento se tuvo en cuenta el factor de desalojo, así como varios cálculos matemáticos. El método se validó para control de calidad, resultó satisfactorio y se aplicó a 11 formulaciones diferentes. Se comprobó que el aumento del tamaño de partícula y de la dosis de quitina en el supositorio favorece la sedimentación hacia la punta del supositorio. En el intervalo analizado los valores de deshomogenización se consideran mínimos, por lo que no se afectó la calidad tecnológica de las formulaciones estudiadas.

*Palabras clave:* Quitina, supositorio, deshomogenización.

Los supositorios son formas farmacéuticas sólidas, por lo que se recomienda estimar la posible deshomogenización del principio activo dentro de la dosis unitaria. La mayoría de los métodos propuestos incluyen la cuantificación del fármaco en las diferentes porciones del supositorio: punta, base y en menor proporción en la zona media.<sup>1</sup>

La quitina es un polímero natural de probado efecto como acelerador de la cicatrización que se ha formulado en forma de supositorios<sup>2</sup> para el tratamiento de fisuras anales agudas.<sup>3</sup>

La dificultad para determinar cuantitativamente la quitina presente en formas farmacéuticas mediante métodos directos, debido a su limitada solubilidad y reactividad,<sup>4</sup> ha conllevado a la aplicación de técnicas gravimétricas.<sup>5</sup> Estos procedimientos resultan largos y engorrosos, por lo que su aplicación a la determinación de deshomogenización de quitina en supositorios tiene múltiples desventajas.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método alternativo sencillo para estimar la deshomogenización de la quitina, sin necesidad de recurrir a la gravimetría como método cuantitativo de análisis.

#### MÉTODOS

*Materias primas.* Quitina polvo. Fabricante Empresa “Mario Muñoz”. Cuba. Lote 9801 CM: F 590006050.

*Reactivos .* Etanol 96 ° pn.

*Productos analizados .* Supositorios de quitina.

*Método propuesto para calcular la deshomogenización de la quitina en el supositorio*

Se desarrolló un método basado en la determinación de la deshomogenización de la quitina en el supositorio a partir de la relación de densidad entre la punta y la base del supositorio.

Se tomó un matraz aforado de 100 mL, previamente pesado en balanza analítica SARTORIUS 1720 (capacidad 200 g ), se le añadió etanol al 96 % hasta el aforo con el objetivo de determinar la densidad del etanol a partir del peso. Se dividieron cuidadosamente los supositorios en 3 porciones, fueron de interés las puntas y la parte posterior. Se introdujeron 5 puntas previamente pesadas en un matraz aforado igualmente tarado de 100 mL, el cual se enrasó con etanol 96 % y se pesó en balanza analítica. Igual procedimiento se le realizó a la parte posterior del supositorio (5 bases previamente pesadas). Después se determinó la densidad de las distintas partes con ayuda de las expresiones siguientes:

$$d = m / V \quad (1)$$

donde:

d = densidad (g/mL)

m = masa (g)

V = volumen (mL)

Si se considera que se emplearon matraces aforados de 100 mL:

$$V_{\text{supositorio}} + V_{\text{alcohol}} = 100 \text{ mL}$$

$$\text{por lo que } V_{\text{supositorio}} = 100 - V_{\text{alcohol}} \quad (2)$$

Se despeja m de (1):

$$m_{\text{supositorio}} = V_{\text{supositorio}} \times d_{\text{supositorio}} \quad (3) \text{ y } m_{\text{alcohol}} = V_{\text{alcohol}} \times d_{\text{alcohol}} \quad (4)$$

$$\text{Queda: } m_{\text{alcohol}} = m_{\text{total}} - m_{\text{supositorio}} \quad (5)$$

Se despeja  $V_{\text{alcohol}}$  de (1) y se sustituye  $m_{\text{alcohol}}$  por (5):

$$V_{\text{alcohol}} = m_{\text{total}} - m_{\text{supositorio}} / d_{\text{alcohol}} \quad (6)$$

Se despejó d supositorio en (1) y se sustituye por (2) y por (6), resulta:

$$d_{\text{supositorio}} = m_{\text{supositorio}} / (100 - V_{\text{alcohol}}) = m_{\text{supositorio}} / (100 - [(m_{\text{total}} - m_{\text{supositorio}}) / d_{\text{alcohol}}])$$

El cálculo se realizó por triplicado para las puntas y las bases del supositorio. Se determinó el cociente entre  $d_1$  (densidad en la punta) y  $d_2$  (densidad en la base). Se consideró como criterio que el valor promedio obtenido para  $d_1/d_2$  no difiera significativamente de uno para  $\alpha = 0,05$  al aplicar la prueba de la t de Student (prueba de un extremo, una vez comprobada la distribución normal de la muestra por la prueba Kolmogorov-Smirnov).

Además se determinó el incremento de quitina en la punta a partir del factor de desalojo (FD), el cual es una relación de densidades si se tiene en cuenta que el volumen del supositorio es fijo:

$$FD = d_{\text{excipiente}} / d_{\text{Quitina}}$$

$$FD = g_{\text{excipiente}} / g_{\text{Quitina}}$$

Si se considera que la suma de las fracciones (X) es la unidad:

$$X_{\text{Quitina}} + X_{\text{excipiente}} = 1$$

Resulta que la densidad en la punta:  $d_1 = X_{\text{Quitina}1} d_{\text{Quitina}} + X_{\text{excipiente}} d_{\text{excipiente}}$

la densidad en la base:  $d_2 = X_{\text{Quitina}2} d_{\text{Quitina}} + X_{\text{excipiente}} d_{\text{excipiente}}$

se despeja  $X_{\text{excipiente}} = 1 - X_{\text{Quitina}}$  y se sustituye en las expresiones anteriores:

$$d_1 = X_{\text{Quitina}1} d_{\text{Quitina}} + (1 - X_{\text{Quitina}1}) d_{\text{excipiente}} \text{ y } d_2 = X_{\text{Quitina}2} d_{\text{Quitina}} + (1 - X_{\text{Quitina}2}) d_{\text{excipiente}}$$

Se obtiene factor común  $X_{\text{Quitina}}$  en cada caso, se multiplica  $d_2$  por -1 y se restan ambas expresiones:

$$d_1 = X_{\text{Quitina}1} (d_{\text{excipiente}} - d_{\text{Quitina}}) + d_{\text{excipiente}}$$

$$\text{Se multiplica por -1: } -d_2 = -X_{\text{Quitina}2} (d_{\text{excipiente}} - d_{\text{Quitina}}) - d_{\text{excipiente}}$$

$$\text{Al restar queda: } d_1 - d_2 = (X_{\text{Quitina}1} - X_{\text{Quitina}2}) (d_{\text{excipiente}} - d_{\text{Quitina}})$$

$\Delta X$ : Diferencia de la fracción de quitina entre la punta (1) y la base (2) del supositorio

$$\Delta X = X_{\text{Quitina}1} - X_{\text{Quitina}2}$$

Despejó  $\Delta X$ :

$$\Delta X = d_1 - d_2 / (d_{\text{excipiente}} - d_{\text{Quitina}})$$

Donde  $d_1$ ,  $d_2$  fueron calculados y  $d_{\text{excipiente}}$  está disponible como dato

$$d_{\text{Quitina}} = d_{\text{excipiente}} / FD$$

Se utiliza el FD calculado para cada formulación.

Luego se determinó A

$A = \Delta X /$  fracción de principio activo en el supositorio según su dosis

0,05 para 50 mg/g = 100 mg/supositorio

0,10 para 100 mg/g = 200 mg/supositorio

0,15 para 150 mg/g = 300 mg/supositorio

- Porcentaje de deshomogenización =  $A \times 100$
- Incremento de quitina en la punta (mg/g) =  $[A+1] \times$  mg/g de quitina en el supositorio

Los miligramos por gramos de incremento de quitina en la punta deben ser inferiores a 300 mg/g usado como referencia de cantidad máxima que garantiza adecuada homogenización.

#### *Metodología utilizada en la validación del método*

Se realizaron por triplicado las determinaciones de la densidad por desplazamiento del etanol y de la quitina materia prima (8 g), en volumétricos de 100 mL.

Se moldearon por el método tradicional de fusión supositorios de excipiente solo y que contenían quitina al 5; 7,5; 10; 12,5 y 15 %. De estos se analizaron por triplicado en cada caso fracciones de 6 g de masa compacta (sin cavidad axial, ni otros defectos) y se determinó la densidad por desplazamiento mediante la expresión:

$$\text{Densidad} = \text{fracción}_{\text{excipiente}} \times d_{\text{excipiente}} + \text{fracción}_{\text{Quitina}} \times d_{\text{Quitina}}$$

Donde  $d_{\text{excipiente}}$  se calculó para 6 g de base por el mismo procedimiento.

Las fracciones de excipiente y quitina utilizadas se presentan en la tabla 1.

*Linealidad del método.* Se construyó una curva de calibración de concentración de quitina (%) vs densidad (g/100 mL) cuyo intercepto con el eje de las ordenadas corresponde con la densidad del excipiente solo; se emplearon 5 puntos (5-15 %) con 3 réplicas cada uno, procesados por regresión lineal mediante el programa Statistica versión 6.1.

*Exactitud.* Se cargaron 6 g de placebo por triplicado con quitina materia prima equivalente a 5, 10 y 15 %. Se determinó el recobrado por punto, el recobrado promedio y el coeficiente de variación (CV) total. Se aplicaron las pruebas de Cochran y de la t de Student. Se construyó la curva de recuperación procesada por regresión lineal (programa Statistica versión 6.1)

*Repetibilidad.* Se procesaron en iguales condiciones experimentales, por triplicado, porciones equivalentes a 6 g de supositorios que contenían 5, 10 y 15 % de quitina. Se determinó el CV.

*Precisión intermedia.* Participaron 2 analistas en 2 días diferentes en el análisis que se realizó por triplicado de 6 g de supositorios que contenían 10 % de quitina. Los resultados se compararon por la prueba de la t de Student y por la prueba F para cada factor analizado: analista y día. Además se determinó el CV total.

Tabla 1. Relación de las fracciones de excipiente y quitina utilizadas en la validación del método

Concentración de quitina (%)	Fracción de quitina	Fracción de excipiente
5,0	0,050	0,950
7,5	0,075	0,925
10,0	0,100	0,900
12,5	0,125	0,875
15,0	0,150	0,850

## RESULTADOS

Los resultados de la validación del método se resumen en la tabla 2.

El valor de densidad que intercepta al eje Y corresponde con la densidad del excipiente utilizado que es de 0,95, por lo que es imposible que el intercepto sea cero. El cumplimiento de los restantes criterios establecidos garantiza la elevada proporcionalidad de la respuesta obtenida en función de la concentración de quitina en el intervalo de 50 a 150 %, tal como se observa en la tabla 2.

Tabla 2 . Resultados de la validación del método para determinar deshomogenización de quitina en supositorios

Parámetro	Resultados	Criterio de aceptación
Linealidad del método	$Y = 0,0057X + 0,9444$ $r = 0,9908$ $r^2 = 0,9803$ $t_{exp} > t_{tab} (\alpha = 0,05; n=13)$ significativo $t \Rightarrow 397,2487 > 2,16$ $b = 0,0057$ $t = 25,4164$ $p = 0,0000$	$Y = bx + a$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ Intercepto no significativo $t_{exp} < t_{tab} (2,16)$ $b \cong 1$ t alta $p \leq 0,005$
Exactitud	$Y = 0,00569X + 0,9448$ $r = 0,99506$ $r^2 = 0,99015$ $t_{exp} > t_{tab} (\alpha = 0,05; n=7)$ $t \Rightarrow 407,79 > 2,36$ $b = 0,00569$ $t = 26,5371$ $p = 0,0000$	$Y = bx + a$ $r \geq 0,99$ $r^2 \geq 0,98$ Intercepto no significativo $t_{exp} < t_{tab} (2,36)$ $b \cong 1$ t alta $p \leq 0,005$
	$R_{total} = 97,04\%$	$R_{total} = 97-103\%$

	CV <sub>total</sub> = 2,54 %	CV <sub>total</sub> ≤ 3,0 %
	G <sub>exp</sub> = 0,7745 G <sub>tab</sub> = 0,8709	Prueba de Cochran G <sub>exp</sub> < G <sub>tab</sub> ; α = 0,05; K=3; n=3
	t <sub>exp</sub> ( 0,3875 ) < t <sub>tab</sub>	Prueba t Student t <sub>exp</sub> < t <sub>tab</sub> (12,71)
Repetibilidad	CV <sub>50 %</sub> = 1,48% CV <sub>100 %</sub> =0,56% CV <sub>150 %</sub> =1,16 %	CV ≤ 1,5 %
Precisión intermedia	CV= 2,56 %	CV <sub>total</sub> ≤ 3,0 %
	F <sub>exp</sub> = 0,5428; t <sub>exp</sub> = 0,5363	Fischer(F) y Student(t) entre analistas F <sub>tab</sub> = 5,05; t <sub>tab</sub> = 2,23
	F <sub>exp</sub> =1,1543; t <sub>exp</sub> =0,3664	Fischer (F) y Student (t) entre días
		F <sub>tab</sub> = 5,05; t <sub>tab</sub> = 2,23

La densidad promedio de la quitina obtenida por desplazamiento fue 1,4746 g/100 mL.

La curva de recuperación y las restantes pruebas estadísticas aplicadas para comprobar la exactitud del método avalaron la mínima influencia de errores sistemáticos.

La precisión se comprobó mediante la repetibilidad y la precisión intermedia. Los resultados estuvieron acordes con los criterios establecidos, por lo que fue mínima la influencia de los errores aleatorios en los niveles de concentración evaluados, así como frente a los factores días y analistas.

La relación ideal entre d<sub>1</sub> y d<sub>2</sub> es la unidad, pues esto significa que no existen diferencias entre la densidad debida a la Quitina que se encuentra en la punta (d<sub>1</sub>) y en la base del supositorio (d<sub>2</sub>).

Los valores fueron ligeramente superiores a uno, según se observa en la tabla 3, lo cual significa que existe una tendencia al incremento del principio activo en la punta, resultado lógico ya que la quitina es más densa que el excipiente y el supositorio es una suspensión. El principio activo que se suspendió en la base, permaneció el tiempo de enfriamiento en reposo. Al tener mayor densidad que la base, el fármaco sedimenta y se incrementa la fracción d<sub>1</sub>.

Tabla 3. Resultados de la aplicación del método a 11 formulaciones de diferente composición en cuanto a tamaño de partícula y dosis de quitina según diseño factorial

Ensayo	Tamaño partícula promedio X <sub>1</sub> (mym)	Dosis de quitina X <sub>2</sub> (mg/g)	Factor de desalajo	d <sub>1</sub> /d <sub>2</sub> promedio Media ± DE	t calculada α =0,05 y 2 g .l.	Incremento de quitina en la punta (mg/g)
I	58,0	50	0,62	1,024±0,08	0,1732	50,09
II	85,5	50	0,56	1,003±0,56	0,0031	53,73
III	112,5	50	0,68	1,001±0,89	0,0006	50,92
IV	58,0	100	0,70	1,010±0,76	0,0076	106,50
V	85,5	100	0,63	1,041±0,94	0,0252	124,88
VI	112,5	100	0,65	1,047±1,02	0,0266	127,20

VII	58,0	150	0,74	1,030±0,47	0,0368	174,36
VIII	85,5	150	0,80	1,058±0,86	0,0389	186,80
IX	112,5	150	0,71	1,061±0,52	0,0677	188,75
X	85,5	100	0,61	1,045±0,44	0,0600	125,70
XI	85,5	100	0,63	1,039±0,23	0,1000	123,00

$$\text{Deshomogenización} = 1,045 + 0,011X_1 + 0,028X_2$$

$$F = 2,165 (N_1 = 5 \text{ y } N_2 = 2); F_{\text{critico}} = 28 (\alpha = 0,05); S_2 = 0,0001$$

No obstante, los valores son muy próximos a uno y según la prueba de la t de Student de un extremo, no difieren estadísticamente del valor ideal, según se aprecia en la tabla 3, ya que las t calculadas  $< t_{\text{critica}}$  (4,30 para  $\alpha=0,05$  y 2 grados de libertad).

A mayor tamaño de partícula, se debe esperar mayor velocidad de sedimentación y por tanto, se incrementa la relación  $d_1/d_2$ . Para el aumento de la concentración con el mismo tamaño de partícula, se observa que aumenta la cantidad de masa sedimentada y por lo tanto, resultará mayor la relación  $d_1/d_2$ .

Para tener un criterio sobre si la deshomogenización de los supositorios era elevada o no, se asumió como límite para el incremento en la punta 300 mg/g (cantidad de polvo de referencia). Esta cantidad aparece en supositorios de alta dosificación. Aunque es una cantidad que parece elevada, por criterio de expertos se conoce que es posible alcanzar la cohesividad requerida en este tipo de forma farmacéutica. Por consiguiente, aunque ocurra una sedimentación hacia la punta del supositorio hasta valores de 300 mg/g durante el proceso de elaboración del supositorio, la cantidad de base presente es capaz de proporcionar la cohesividad necesaria y por tanto, no se afecta la calidad de este.

En la tabla 3 se resume la concentración máxima de quitina en la punta, expresada en miligramo por gramo. Todos los valores fueron inferiores a 300 mg/g, lo cual sustenta el criterio de que la deshomogenización no afectó la calidad de los supositorios. La mayor deshomogenización (188,75 mg/g) se obtuvo para la fórmula IX, correspondiente al mayor tamaño de partícula promedio y a la mayor dosis.

Por estos resultados, se puede afirmar que no ocurre una deshomogenización apreciable en ninguna de las concentraciones de principio activo ensayadas. Los gráficos de superficie-respuesta y contorno que relacionan estos resultados se muestran en la figura. Si se considera para cada dosis la mínima deshomogenización, las fórmulas con buenos resultados serían para 50 mg/g las elaboradas con cualquiera de los tamaños de partícula analizados. Para 100 mg/g, sería más recomendable trabajar con el valor menor, aunque los tamaños de partícula intermedios no brindan valores muy elevados de  $d_1/d_2$ . A dosis de 150 mg/g, lo mejor sería trabajar a menores tamaños de partícula, es decir a 58  $\mu\text{m}$ .

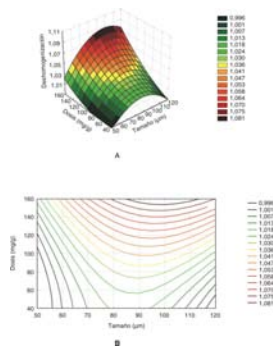


Fig. Representación de superficie-respuesta (A) y contorno (B) para la deshomogenización de la quitina en los supositorios; se consideró la interacción con la dosis de quitina y el tamaño de partícula.

## DISCUSIÓN

El método propuesto simplifica en gran medida la estimación de posible deshomogenización de quitina en los supositorios. La demostración de su validez permite su aplicación al estudio de diversos factores en la calidad tecnológica de nuevas formulaciones en fase de desarrollo, sin necesidad de recurrir a largos y engorrosos métodos gravimétricos de cuantificación.

La utilización de este método constituye una nueva alternativa no solo para formulaciones a partir de quitina, sino de otros productos formulados con analitos cuyos métodos de estimación cuantitativa requieran de recursos no disponibles o de largos períodos de experimentación, los cuales limiten el estudio de este parámetro de gran importancia en la etapa de investigación-desarrollo.

## SUMMARY

### Development and validation of a new method for chitin dehomogenization estimation in suppositories

For the first time, the development of a simple alternative method to determine chitin dehomogenization in rectal suppositories was addressed in this paper. The suggested method is based on determination of dehomogenization from the ratio of chitin density of the tip and of the base of suppository. For estimation of the sliding density, the clearing factor as well as various mathematical calculations were taken into consideration. The method was validated for quality control, it was satisfactory and applied in 11 formulations. It was proved that the increase in chitin particle size and dose in suppository favors sedimentation to the tip of suppository. In the analyzed interval, the dehomogenization values were considered minimal, so the technological quality of the studied formulations was not affected.

*Key words:* Chitin, suppository, dehomogenization.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faulí C, Trillo I. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Ediciones Madrid SA; 1993. p. 739-75.



2. Bilbao OO, Nieto OM, Suárez Y, González HM, García O, Fernández M, et al. Supositorios de quitina. Patente de invención. Cuba. CU 22908, 2003.
3. Suárez Y, Pérez B, Gálvez SF, Puente X, Hernández A, Beltrán I. Evaluación del efecto terapéutico de los supositorios de quitina en la fisura anal aguda. Rev Cubana Farm. 2001; 35 (Suplemento Especial):23-6.
4. Suárez Y, Almirall I, González HM, Bilbao OO, Nieto OM. Metodología para estudios de estabilidad química en formulaciones de Quitina. Rev Cubana Farm. 2000;34 (1):12-9.
5. Suárez Y, Bilbao O, González HM, Nieto OM, Azoy AL. Estabilidad de supositorios de quitina. Rev Cubana Farm. 2000;34 (2):100-6.

Recibido: 22 de junio de 2005. Aprobado: 22 de julio de 2005.

M. *Oscar García Pulpeiro*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ave 23 No. 14425 entre 222 y 214. La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: [yania\\_as@yahoo.es](mailto:yania_as@yahoo.es)

<sup>1</sup>Maestro en Tecnología y Control de Medicamentos.

<sup>2</sup>Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesora Asistente. Instituto de Farmacia y Alimentos.