

Estudio de estabilidad acelerada del ingrediente activo D-004 en diferentes envases

Accelerated stability study of D-004 active ingredient in different containers

Eduardo A. Rodríguez Leyes^I; Roxana C. Sierra Pérez^{II}; Víctor L. González Canavaciolo^{III}; David Marrero Delange^{IV}; Roxana Vicente Murillo^V

^I Máster en Ciencias en Química Analítica. Investigador Agregado. Centro de Productos Naturales (CPN), Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II} Máster en Ciencias en Química Farmacéutica. Investigadora Agregada. CPN, CNIC. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. CPN, CNIC. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{IV} Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. CPN, CNIC. Ciudad de La Habana, Cuba.

^V Técnica Media en Farmacia Industrial. CPN, CNIC. Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: D-004 es un nuevo ingrediente activo en fase de investigación y desarrollo, obtenido de los frutos de *Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook.

OBJETIVO: precisar la estabilidad de D-004 en condiciones aceleradas en frascos de vidrio ámbar, de tereftalato de polietileno y de polietileno de alta densidad.

MÉTODOS: muestras de 3 lotes se almacenaron a (40 ± 2) °C y (75 ± 5) % de humedad relativa durante 12 meses. Se determinaron las características organolépticas, la densidad relativa, el índice de refracción (USP 27) y el contenido de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.

RESULTADOS: los parámetros medidos se mantuvieron dentro de las especificaciones de calidad establecidas, con excepción del contenido de ácidos grasos, que en los frascos de tereftalato y polietileno disminuyó significativamente a los 3, 6 y 4,5 meses, respectivamente.

CONCLUSIONES: el vidrio ámbar protege al D-004 de la degradación más que los envases plásticos estudiados.

Palabras clave: ácidos grasos, D-004, estabilidad acelerada, *Roystonea regia*, polietileno de alta densidad, tereftalato de polietileno y vidrio ámbar.

ABSTRACT

INTRODUCTION: D-004 is a new active ingredient under research and development stage, which is obtained from *Roystonea regia* (Kunth) O. F. Cook fruits.

OBJECTIVE: to precise over the D-004 stability under accelerated conditions in amber glass, polyethylene terephthalate and high density polyethylene containers.

METHODS: samples from three batches were stored at (40 ± 2) °C and (75 ± 5) % relative humidity for 12 months. Organoleptic characteristics, relative density, refractive index (USP 27) and fatty acids content by gas chromatography, were determined.

RESULTS: measured parameters were within the set quality specifications, except for fatty acids content that significantly decreased in polyethylene terephthalate and high density polyethylene containers after 3, 4 and a half and 6 months, respectively.

CONCLUSIONS: the amber glass protects more D-004 from degradation than the analyzed plastic containers.

Key words: fatty acids, D-004, accelerated stability, *Roystonea regia*, polyethylene terephthalate, high density polyethylene, amber glass.

INTRODUCCIÓN

El D-004 es un nuevo ingrediente activo obtenido de la fracción lipídica de los frutos de la palma real cubana [*Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook], que se compone fundamentalmente de una mezcla de ácidos grasos (AG) libres entre 8 y 18 átomos de carbono; los ácidos oleico, láurico, palmítico y mirístico son los componentes mayoritarios. El D-004 ha demostrado reducir la hiperplasia prostática inducida por testosterona en roedores.^{1,2}

Teniendo en cuenta el posible interés terapéutico del D-004, dado que la hiperplasia prostática benigna es una de las enfermedades más frecuentes en los hombres mayores de 50 años,³ y como parte de las etapas de investigación y desarrollo de un nuevo ingrediente activo, se hace necesario realizar los correspondientes estudios de estabilidad. Sin embargo, antes de iniciar los estudios a largo plazo es preciso definir el material de envase a emplear. Es por ello que generalmente se realizan estudios previos de estabilidad acelerada en diferentes posibles envases a (40 ± 2) °C y (75 ± 5) % de humedad relativa (HR), condiciones más drásticas que las de la zona climática IV [30 ± 2] °C y $[70 \pm 5]$ % de HR, donde se incluye Cuba. De esta forma, se obtienen resultados en un corto tiempo y se conoce el impacto de posibles incursiones fuera de la zona IV, lo que pudiera ocurrir durante la transportación del ingrediente activo (International Conference of Harmonization).

Guidance for industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products. September 25, 2003).⁴

Las razones anteriores motivaron el estudio de la estabilidad acelerada del ingrediente activo D-004 en frascos de vidrio ámbar, de tereftalato de polietileno (TFPE) ámbar y de polietileno de alta densidad (PEAD) blanco, materiales usualmente empleados para este tipo de sustancias.

MÉTODOS

Los estudios se llevaron a cabo con 3 lotes obtenidos a escala piloto: 190106, 180406 y 141106 (con contenidos de AG de 89,6; 87,3 y 88,8 %, respectivamente) y las muestras se colocaron en una desecadora con una disolución saturada de cloruro de sodio dentro de una estufa a (40 ± 2) °C, lo que permitió alcanzar las condiciones requeridas para el estudio, (40 ± 2) °C de temperatura y (75 ± 5) % de HR.⁵ Los muestreos se realizaron al inicio, al mes y a los 2, 3, 6 y 12 meses, para lo cual se tomó de forma aleatoria un frasco nuevo de cada lote. En cada muestreo se determinaron las características organolépticas, la densidad relativa y el índice de refracción, determinados según se describe en la USP 27.⁶ También se determinó el contenido de AG mediante una metodología analítica por cromatografía de gases debidamente validada.⁷

RESULTADOS

Los resultados permitieron conocer que los parámetros que rigieron el estudio se mantuvieron en los 3 envases dentro de los límites de confianza establecidos en las especificaciones de calidad del D-004 (líquido aceitoso de color amarillo-naranja a pardo-verdoso, con densidad entre 0,82 g/mL y 0,97 g/mL e índice de refracción entre 1,440 y 1,462), con excepción del contenido de AG.

En los frascos de vidrio ámbar el contenido de AG durante los 12 meses de estudio no varió significativamente en relación con el contenido inicial en ninguno de los 3 lotes. La comparación de los contenidos de AG en los 3 lotes se efectuó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA), para 95 % de confianza y con el tiempo como covariable. El análisis estadístico demostró el comportamiento similar de los 3, porque no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,4713$).⁸ Esto permitió construir un gráfico del contenido promedio de los 3 lotes en función del tiempo ([Fig. 1](#)), donde se aprecia que el límite de confianza inferior ($p = 0,05$) del comportamiento promedio no intercepta el límite de aceptación establecido (95 % del contenido declarado para el tiempo inicial), por lo que el ingrediente activo D-004 resiste hasta 12 meses en las condiciones de este estudio (International Conference of Harmonization. Guidance for industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products. September 25, 2003).⁴

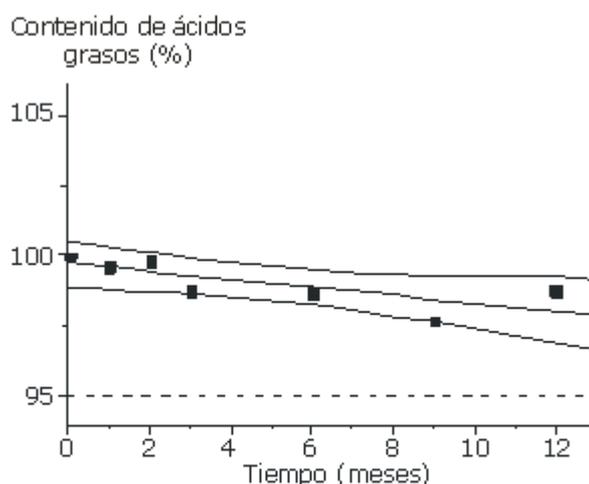


Fig. 1. Contenido promedio de ácidos grasos en D-004 ingrediente activo almacenado en frascos de vidrio ámbar durante 12 meses.

En los frascos ámbar de TFPE se mantuvo el contenido de AG dentro de los límites establecidos durante 3 meses, pero a los 6 meses, 2 de los lotes presentaron una disminución significativa ($< 95\%$ del contenido inicial), por lo que se detuvo el estudio.⁴ Los lotes degradados presentaron un patrón de degradación similar según el ANCOVA realizado ($p = 0,9226$)⁹ y como se aprecia en la gráfica (Fig. 2) el límite de confianza inferior ($p = 0,05$) del contenido promedio de AG interceptó el criterio de aceptación a los 3,6 meses, máximo tiempo de vida útil del D-004 en estas condiciones (International Conference of Harmonization. Guidance for industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products. September 25, 2003).⁴

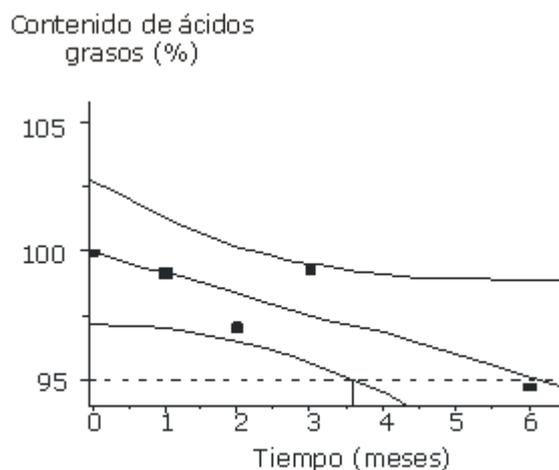


Fig. 2. Contenido promedio de ácidos grasos en D-004 ingrediente activo almacenado en frascos ámbar de tereftalato de polietileno durante 6 meses.

En los frascos de PEAD se mantuvo el contenido de AG dentro de los límites establecidos durante 6 meses; sin embargo, a los 9 meses se detuvo el estudio al observarse que los 3 lotes mostraron una disminución significativa en su contenido

de AG.⁴ Al igual que en el caso anterior, los lotes degradados se comportaron de manera similar ($p = 0,3716$), lo que permitió construir el gráfico con el contenido promedio (Fig. 3).⁸ En este se aprecia que el límite de confianza inferior ($p = 0,05$) del contenido promedio de AG interceptó el criterio de aceptación a los 4,5 meses, período máximo de vida útil en estas condiciones (International Conference of Harmonization. Guidance for industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products. September 25, 2003).⁴

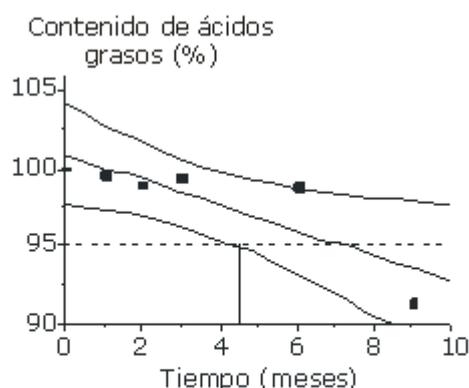


Fig. 3. Contenido promedio de ácidos grasos en D-004 ingrediente activo almacenado en frascos de polietileno de alta densidad durante 9 meses.

DISCUSIÓN

La disminución del contenido de AG observada en los envases plásticos se debe específicamente a una disminución en el contenido de los AG insaturados de 18 átomos de carbono, lo cual se demostró mediante cromatografía de gases. Esta disminución es de esperarse teniendo en cuenta que estos son más propensos a la oxidación que los ácidos saturados que componen el D-004.⁹ Esos procesos de oxidación suelen ocurrir con mayor rapidez cuando se emplean plásticos como material de envase, porque son más permeables al oxígeno que el vidrio.¹⁰ Efectos similares sobre el contenido de AG insaturados por causa del empleo de diferentes materiales de envase han sido también observados para el aceite de oliva.¹¹

En conclusión, el vidrio ámbar protege al ingrediente activo D-004 de la degradación más que los envases plásticos estudiados, los cuales tienen en cambio la ventaja de ser menos frágiles. De ser necesario el empleo de alguno de estos envases plásticos, resultaría más conveniente el de PEAD, donde se observó una vida útil mayor que en el de TFPE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carbajal D, Arruzazabala ML, Más R, Molina V, Rodríguez E, González V. Effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on inhibiting prostatic hyperplasia induced with testosterone or dihydrotestosterone in a rat model: A randomized, controlled study. *Curr Ther Res.* 2004;65(6):505-14.
2. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Rostoynea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2005; 31(5-6):193-7.
3. Bhargava S, Canda AE, Chapple CR. A rational approach to benign prostatic hyperplasia evaluation: recent advances. *Curr Opin Urol.* 2004;14(1):1-6.
4. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación No. 24 -Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos. Cuba: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos; 2000.
5. Greenspan L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J Res Nat Bureau Standars A Phys Chem.* 1977;81A(1):89-96.
6. The United States Pharmacopoeia 27 and National Formulary 22 (USP27NF22), Supplement 1 [CD-ROM]. USA: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc; 2004.
7. Rodríguez-Leyes EA, Marrero D, González VL, Sierra R, Adames Y. Validación de un método por Cromatografía de Gases para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo. *Revista CENIC Ciencias Químicas (en prensa)*; 2009.
8. International Conference of Harmonization. Guidance for Industry Q1E Evaluation of Stability Data; 2003.
9. Litwinienko G, Kasprzycka GT. Study on the autoxidation kinetics of fats components by differential scanning calorimetric. 2. Unsaturated fatty acids and their esters. *Ind Eng Chem Res.* 2000;39(1):13-7.
10. Leo DA. Effect of packaging on oil product quality. *J Am Oil Chem Soc.* 1983;60(2):301-3.
11. Vekiari S, Papadopoulou P, Kiritsakis A. Effects of processing methods and commercial storage conditions on extra virgin olive oil quality indexes. *Grasas y Aceites.* 2007; 58(3):237-42.

Recibido: 4 de mayo de 2009.

Aprobado: 10 de agosto de 2009.

M. C. *Eduardo A. Rodríguez Leyes*. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Calle 198 e/ 19 y 21, Reparto Atabey, Playa. Ciudad de La Habana, Cuba. Fax (537) 33 6837. Teléfs.: 271 42 25 y 271 42 38. Correos electrónicos: eduardo.rodriguez@cnic.edu.cu; eduardoar1@yahoo.com