

ESTABILIDAD EN VIDA DE ESTANTE DEL CIKRON-H

A. Escobar*, Tania Pérez**, Yamilka Riverón***, Gleiby Melchor*, Luz M. Sánchez*,
O. Fernández* y Evangelina Marrero*

*Departamento de Química-Farmacología-Toxicología; **Unidad de Producciones Biofarmacéuticas;
***Aseguramiento de Calidad. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10,
San José las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: escobar@censa.edu.cu

RESUMEN: Se evaluó la estabilidad del producto CIKRON-H a tiempo real durante 12 meses en dos presentaciones (frascos de polietileno de alta densidad con capacidad para 30 y 500 mL). Los indicadores de pH, tanino totales (TT), porcentaje de compuesto fenólicos polimerizados (CFP), perfil cromatográfico del CFP y halo de inhibición del producto no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dichas presentaciones a tiempo cero. Los indicadores de porcentaje de CFP, perfil cromatográfico del CFP y halo de inhibición del producto fueron lo que más variaron en el tiempo, mostrando coeficiente de regresión significativos ($P < 0.00001$) a partir del análisis de regresión múltiple. El estudio *in vivo* para la evaluación de la actividad antimicrobiana y el efecto acelerador en el proceso de curación de heridas de los lotes de CIKRON-H en su presentación de 30 mL a los 12 meses presentaron un comportamiento similar con un lote de CIKRON-H fresco (dos meses de producidos). El período de validez del producto CIKRON-H se estableció en 12 meses.

(Palabras clave: CIKRON-H; estabilidad; estudio a tiempo real; polifenoles)

STABILITY OF CIKRON-H ON SHELF LIFE

ABSTRACT: The stability of the product CIKRON-H was evaluated in two presentations at real time during 12 months (flasks of polyethylene of high density with capacity for 30 and 500 mL). The indicators: pH, total tannins (TT), percentage of polymerized polyphenolic compounds (PPC), chromatographic profile of PPC and inhibition halo of the product did not show significant differences ($p < 0.05$) between these presentations at zero time. The indicators that most varied in the time were: percentage and chromatographic profile of PPC and inhibition halo of the product, showing a significant regression coefficient ($p < 0.00001$) from multiple regression analysis. The *in vivo* study for the evaluation of the antimicrobial activity and the accelerating effect in the cure process of skin wounds of the CIKRON-H lots at 12 months presented a similar behavior with a lot of new CIKRON-H (two months old). The validity period of the product CIKRON-H was established in 12 months.

(Key words: CIKRON-H; stability; real time study; polyphenols)

INTRODUCCIÓN

El CIKRON-H es un producto antiséptico y estimulante de la curación de heridas (1, 6) obtenido de la corteza de *Rhizophora mangle* L, con un período de validez de dos años cuando el producto fue sometido a un estudio de envejecimiento acelerado evaluando los indicadores de halo de inhibición, pH y características organolépticas (color, transparencia y presencia de sedimentos) (10).

Múltiples son los factores que influyen en la estabilidad de un producto farmacéutico, entre los que se encuentran: los ambientales (temperatura, humedad y luz), las propiedades físico-químicas del principio activo y de los excipientes, la forma farmacéutica y su composición, los procesos de fabricación y las propiedades del envase utilizado (2).

Con la finalidad de armonizar la información que se requiere para la evaluación de los datos de estudio

de estabilidad de un producto farmacéutico nuevo o conocido, el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) ha establecido la regulación 23-2000 que aborda este tema (2). Esta regulación está acorde con la guía establecida por organismos internacionales para la evaluación de productos medicinales (4, 8), lo que facilita el registro del producto en cualquier país.

Los indicadores que mejor expresan una pérdida de la eficacia del producto son el halo de inhibición y los aspectos físico químicos relacionados con el componente mayoritario en la formulación, aspectos que fueron comprobados durante la estabilidad del producto en condiciones drásticas (5).

La realización de estudios de estabilidad de un producto farmacéutico variará en dependencia del trámite y el objetivo que persiga (2), en cualquiera de los casos los estudios a tiempo real o vida de estante son imprescindibles. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad a tiempo real del CIKRON-H en frascos de polietileno de alta densidad en dos presentaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Se recolectó la corteza de *Rhizophora mangle* L. de árboles adultos de la provincia de la Habana en octubre del 2003, la autenticidad de la planta fue confirmada por el Jardín Botánico Nacional, depositando una muestra de la misma.

El material colectado se secó a temperatura ambiente ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta alcanzar una humedad inferior al 15%, posteriormente se guardó en sacos de polietileno y se almacenó en un local a temperatura ambiente y humedad relativa inferior al 80%.

Los tres lotes del producto CIKRON-H en sus dos presentaciones (30 y 500 mL) fueron proporcionados

por el Laboratorio Mario Muñoz de la Industria Médico Farmacéutica, MINBAS.

Estudio de estabilidad a tiempo real

Las muestras procedentes de los lotes producidos en la empresa farmacéutica a escala industrial, envasados en dos tipos de frascos C30 (30 mL) y C500 (500 mL) fueron conservados a temperatura ambiente ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) con una humedad entre 70-80%. Se evaluaron los indicadores de características organolépticas (color), pH, taninos totales, porcentaje de compuestos fenólicos polimerizados (CFP) y, halo de inhibición en lotes cerrados. En la Tabla 1, se muestran las identificaciones de los lotes y las frecuencias de muestreo en meses.

Evaluaciones biológicas y físico - químicas del producto

La actividad biológica *in vitro* se realizó por la técnica de halo de inhibición del crecimiento de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29740 por un período de difusión de 24 horas (3,12).

Taninos totales (TT): Se realizó mediante una precipitación cuantitativa de los taninos en el extracto acuoso con albúmina sérica y su posterior determinación colorimétrica con cloruro férrico (13).

Compuestos fenólicos polimerizados (CFP): Se precipitaron del extracto acuoso con cloruro de sodio (11) y se caracterizaron por cromatografía líquida de alta resolución, empleando un detector UV (modelo Knauer) a 280 nm en un rango de 002 y una columna de fase reversa (Kromasil 100C18 $5\mu\text{m}$ $15\times 0,4$ cm). Como fase móvil se empleó una solución de metanol al 60% en ácido acético al 1% y se aplicó 10 μL de la muestra previamente filtrada por 0,45 μm . Los cromatogramas fueron registrados utilizando una interfase TIC-8EA y procesados con el software BIOCROM.

TABLA 1. Fecha de producción de los lotes y cronograma de muestreo para lotes de CIKRON-H en Anaquel./
Production date of the lots and sampling chronogram for CIKRON-H lots on real time or shelf life

Identificación	Fecha de producción	Enero/03	Abril/03	Julio/03	Octubre/03	Enero/04
C500011002	Oct 2002	3	6	9	12	
C500020103	Ene 2003		3	6	9	12
C500030103	Ene 2003		3	6	9	12
C30011002	Oct 2002	3	6	9	12	
C30020103	Ene 2003		3	6	9	12
C30030103	Ene 2003		3	6	9	12

Evaluación *in vivo* de la actividad antimicrobiana y el efecto acelerador en el proceso de curación de heridas.

Se evaluó el efecto acelerador en el proceso de curación de heridas, a través de un biomodelo de heridas abiertas realizando observación clínica, midiendo la velocidad de disminución del área de la herida abierta y la proporción de parámetros histológicos en dermis y epidermis de tres lotes de CIKRON-H a los doce meses de producidos y se comparó con un lote de CIKRON-H con un tiempo de 2 meses de transcurrido.

Método de ensayo: Se produjeron heridas abiertas asépticas en la región dorso escapular de ratas Sprague Dawley. Este ensayo se realizó siguiendo el procedimiento descrito por González-Quevedo (7) con algunas modificaciones que se describen en el diseño experimental.

Animales: Se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley, adultas, con un peso promedio entre 180 - 200 g de peso corporal, clínicamente sanas, de piel blanca, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Grupos de tratamiento:

Se conformaron 4 grupos experimentales de 4 animales cada uno para un total de 20 heridas por tratamiento a ensayar.

<u>Grupo</u>	<u>Identificación del lote</u>
I	KB010304 (Lote nuevo)
II	C30011002 (12 meses)
III	C30020103 (12 meses)
IV	C30030103 (12 meses)

Vía de administración:

Se aplicó 0.5 mL de CIKRON-H de forma tópica en las heridas (una vez al día durante 11 días) utilizando un frasco de gotero estéril.

El tamaño de cada herida fue medido al inicio, séptimo y oncenno día de realizadas, a través de la evolución del área (mm²) utilizando el Sistema de Procesamiento Digital de Imágenes MADIP 3.0 Lab Lapdis del Hospital Carlos J. Finlay. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara de video Sony y una tarjeta digitalizadora Eyegraber. Los datos de las áreas fueron automáticamente introducidos en una base de datos.

Diseño y análisis estadísticos:

En el estudio de las presentaciones (C30 mL y C500 mL) en cada uno de los indicadores evaluados, se aplicó un test no paramétrico (Kruskall Wallis).

En el estudio de la estabilidad del producto CIKRON-H se aplicó un análisis de regresión múltiple, analizando como variables dependientes: pH, taninos totales (TT); porcentaje de CFP (%CFP), porcentaje del área en el 1^{er} pico (%área PICO); halo de inhibición (HI) y concentración de CFP (mg/mL) y como variable independiente el tiempo. Se determinó, la ecuación de regresión, el coeficiente de correlación y la probabilidad para cada variable independiente del lote y el frasco. Un estudio similar se realizó para cada presentación independiente del número de lote.

Se empleó el Procedimiento de Modelo Lineal Generalizado del SAS, donde el efecto a evaluar fue el tratamiento y el área inicial se empleó como covariable con vista a eliminar la posible influencia del tamaño inicial en el resultado final. Las variables dependientes fueron los valores de las áreas a los diferentes días de evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especificaciones del producto CIKRON-H brindado por el fabricante se muestran a continuación:

- Características Organolépticas: Color rojo oscuro
- pH: 4-6
- Taninos Totales: 12-27 mg/mL
- Porcentaje de compuestos polifenólicos (CPF): 385%
- Perfil cromatográfico área % (primer pico tr 0.84-1.44): 82-104 %
- Halo de inhibición: 8-10 mm

Los lotes del producto CIKRON-H objeto de estudio en el tiempo cero en sus dos presentaciones mantuvieron las especificaciones de calidad antes mencionadas, no existiendo diferencias entre frascos para cada uno de los indicadores estudiados (Tabla 2). Estos resultados nos permitieron utilizar un solo criterio de evaluación en las dos presentaciones.

Durante el estudio de estabilidad en anaquel todos los lotes en sus dos presentaciones mantuvieron un color rojo oscuro. El pH, los indicadores relacionados con el principio activo (taninos totales, % CFP y perfil cromatográfico) y el halo de inhibición mostraron variaciones dentro de los límites de aceptación del producto en el tiempo (Figuras 1 y 2).

En la Tabla 3 se muestran los resultados del estudio de un análisis de regresión múltiple de los diferentes indicadores de calidad a evaluar en el tiempo independiente del lote y el frasco, observándose que

TABLA 2. Resultado de indicadores de calidad por frasco en el tiempo cero del producto CIKRON-H./ *Result of quality indicators per flask in the time zero of the product CIKRON-H*

	Frasco 30 mL MEDIA±ESM	Frasco 500 mL MEDIA±ESM
pH	4,9±0.06 a	4,9±0.06 a
TT	17,31±0.47 a	18,69±0.94 a
%CFP	95,30±0.68 a	95,80±0.92 a
%_PICO1	92,02±0.72 a	93,08±1.21 a
HI_MM	14,2±0.41 a	14,2±0.41 a

Letras iguales indican no diferencia significativas ($p < 0,05$)

existe afectación de los diferentes indicadores en el tiempo, excepto para el pH. Los indicadores con mayor significación ($p < 0.0001$) son: % CPH, % área del primer pico y el halo de inhibición del producto.

En la Tabla 4 se muestra un resumen del análisis de regresión de las variables en el tiempo independiente del lote por frasco, observándose que el indicador de pH y TT no son significativos en ninguna de las dos presentaciones. El resto de los indicadores se afectan en el tiempo siendo altamente significativo. Las variables de % CFP, % área del pico y HI presenta los mayores valores de regresión

En las Figuras 1 y 2 se muestra el comportamiento de los indicadores que presentaron mayor significación en los frascos de 500 y 30 mL respectivamente por lote. En ambos frascos todos los indicadores del lote 1 se encuentran dentro de los límites de aceptación para el producto existiendo una tendencia en el tiempo de acercarse al límite máximo superior el porcentaje de CFP, mientras el porcentaje del área del primer pico y el halo de inhibición disminuyen en valores cercanos al límite inferior de aceptación.

A los doce meses en los lotes 2 y 3 de ambas presentaciones el indicador de actividad antimicrobiana fue inferior al valor de 10 mm (criterio de aceptación), sin embargo se clasifica como reacción ligera al tener un halo de inhibición superior a los 8 mm. Estos resultados están acorde con los criterios expuestos por Toda y colaboradores (13) que plantean que el halo de inhibición para esta categoría oscila entre 8-12 mm, por tanto podemos afirmar que los lotes evaluados mantienen su actividad biológica a los 12 meses aunque exista una tendencia a disminuir su actividad en el tiempo.

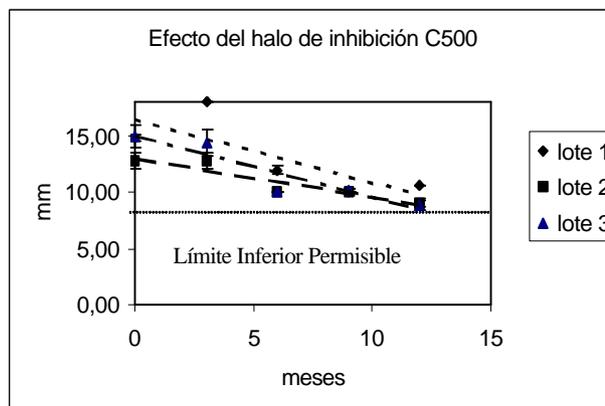
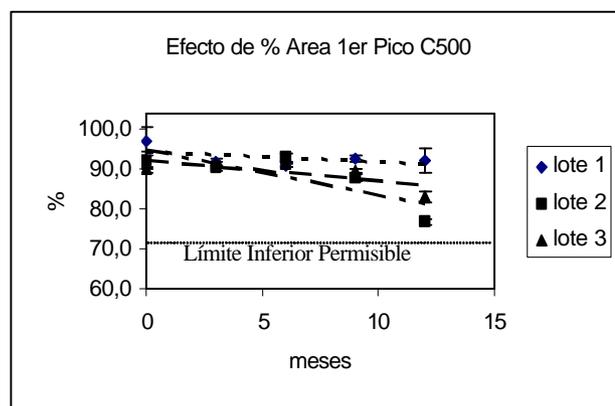
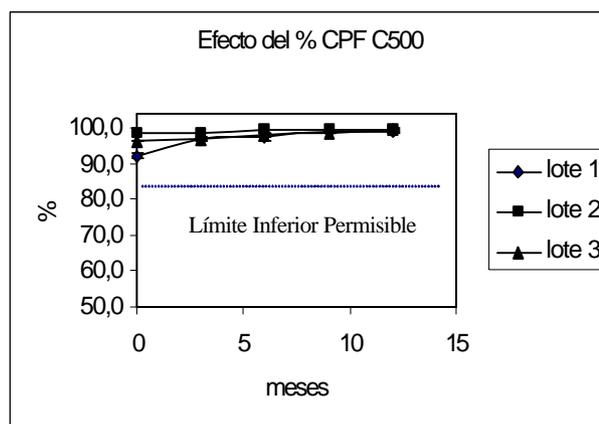


FIGURA 1. Comportamiento de los indicadores del producto CIKRON-H a tiempo real en frascos de 500 mL./ *Behaviour of CIKRON-H indicators at real time in 500 mL flasks.*

En el lote 2 de ambas presentaciones el indicador referente al porcentaje de área del primer pico fue inferior al límite permissible propuesto, no así en el resto de los lotes donde el indicador osciló por encima del 80%. Esta disminución en el valor del porcentaje del primer pico puede deberse a la formación de com-

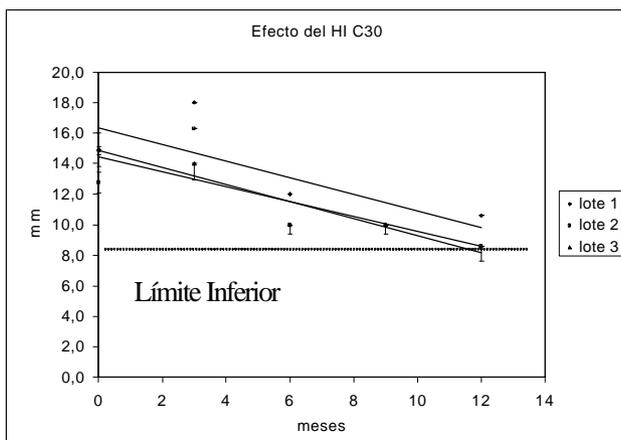
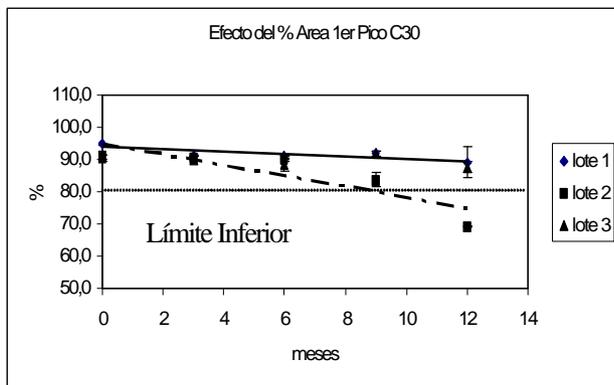
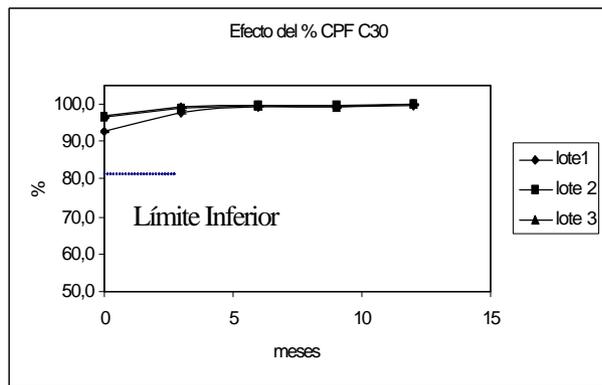


FIGURA 2. Comportamiento de los indicadores del producto CIKRON-H a tiempo real en frasco de 30 mL./ *Behaviour of CIKRON-H indicators at real time in 30 mL flask.*

puestos oxidados de bajos pesos moleculares que al separarse en la columna cromatográfica no coinciden con los tiempos de retención del primer pico y por tanto al procesar el cromatograma disminuye su área y el porcentaje total del mismo.

TABLA 3. Resumen del análisis de regresión para los lotes cerrados independiente del lote y el frasco.(n=157)./ *Summary of the regression analysis for the closed lots independently from the lot and flask. (n=157)*

	r	R2	P.<0.05
pH	0.036	0.001	NS
% CFP	0.700	0.490	Sig ***
TT	0.220	0.049	NS
% área 1er Pico	0.568	0.322	Sig ***
HI mm	0.818	0.668	Sig ***

De manera general e integrando los resultados de las evaluaciones físico-químicas y biológicas podemos afirmar que las muestras presentan una estabilidad consistente hasta los nueve meses almacenados a tiempo real o vida de estante en todos los indicadores evaluados y a partir de los 12 meses comienzan algunos indicadores acercarse al valor mínimo permitido. Sin embargo para una definición más confiable del tiempo real de caducidad se realizó una evaluación "in vivo" de la actividad antimicrobiana y el efecto acelerador en el proceso de curación de heridas en un lote de CIKRON-H a los doce meses de preparado, en la presentación de 30 mL.

Resultados de la evaluación *in vivo* de la actividad antimicrobiana y el efecto acelerador en el proceso de curación de heridas.

En la observación clínica se evidenció la presencia de reacciones inflamatorias ligeras, las que fueron disminuyendo con la aplicación del tratamiento, mientras la presencia de exudado, que se tomó como indicación de contaminación bacteriana, no fue observada en ninguno de los grupos experimentales. La morfología circular de las heridas se fue deformando poco a poco hasta el cierre total. En todas las heridas se observó la presencia de una capa, con un color rojizo más intenso en las tratadas con el lote nuevo y disminuyó la intensidad del color en las tratadas con el lote más viejo. Esta capa se mantenía de aplicación en aplicación.

Los resultados en cuanto a la velocidad de reducción del área de las heridas en los diferentes lotes de CIKRON-H con un año de producidos mantienen un comportamiento similar al lote recién fabricado como se muestra en la Tabla 5. Los porcentajes de reducción de las heridas obtenidos en este trabajo son similares a los reportados para este mismo producto, cuando se evaluó el efecto antiséptico *in vivo* frente: *S. aureus*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*; *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* (9).

TABLA 4. Resultados del análisis de regresión en el tiempo para lotes cerrados para cada frasco (A C500 y B C30)./ *Results of the regression analysis in the time for closed lots for each flask (A C500 and B C30)*

Frasco C500 n=90	pendiente	intercepto	r	r ²	P.<0.05
pH	0,016	4.80	0.1973	0,0389	NS
% CFP	0.295	96,22	0.6788	0.4608	Sig ***
TT	0,227	19,32	0.2692	0.0724	NS
% área 1 ^{er} Pico	-0,631	93.82	0.628	0.3952	Sig ***
HI mm	-0,478	14.76	0.820	0.6738	Sig ***

Frasco C30 n=67	pendiente	intercepto	r	r ²	P.<0.05
pH	-0.006	4,8	0.1965	0,038	NS
% CFP	0,3580	96,31	0.7533	0,5675	Sig ***
TT	0,2518	19,11	0.165	0,027	NS
% área 1 ^{er} Pico	-0.701	92.93	0.5200	0,2707	Sig ***
HI mm	-0,522	15.22	0.8145	0,6635	Sig ***

TABLA 5. Resultados del porcentaje de reducción del área de la herida en los diferentes tratamientos./ *Results of the wound area reduction percentage in the different treatments*

Grupo	Reducción del área de las heridas (%)
I	72.41 abc
II	81.37 a
III	70.19 c
IV	71.83 abc

A pesar que no existe diferencia entre los lotes almacenados durante un año con el lote preparado fresco, los lotes 2 y 3 presentaron menores valores de reducción en la heridas, lo que corrobora en los análisis realizados a partir de las especificaciones de calidad, donde se planteó que ambos lotes a los 12 meses tendían acercarse a sus valores límites de aceptación del producto.

Consideraciones Generales

- No existen diferencia en las dos presentaciones del CIKRON-H.
- Los resultados obtenidos "in vivo" demuestran que al año de producidos los lotes mantienen su eficacia al compararse con un lote nuevo y corroboran que los ensayos "in vitro" pueden resultar adecuados para los estudios de calidad de un producto.
- Los tres lotes cumplen sus especificaciones de calidad y se estableció un período de validez de 12 meses para el producto.

REFERENCIAS

1. Bulnes, C.; Fernandez, O.; Navarro, D.; Marrero, E.; Rueda, D.; Figueroa, O.; Melchor, G y Proenza T. (2001): Healing effect of a red mangrove extract on open aseptic wounds in rats., *Rev. Salud Ani.l* 23(2):102-108.
2. CECMED (2000) Regulación 23/2000 Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos.
3. Daguét, G.I. y Chabbert, Y.A. (1977): Serología Bacteriana. Antibióticos en Bacteriología Médica In Técnicas en Bacteriología III, cap. 2, Edición Jims, Barcelona.
4. EMEA (2003): ICH Q1E Evaluation of stability data. Note for guidance on Evaluation of stability data. CPMP/ICH/420/02 <http://www.emea.eu.int>
5. Escobar, A.; Pérez, Tania; Riverón, Yamilka; Sánchez, Luz M., Fernández, O. y Marrero, Evangelina (2008): Estabilidad en condiciones drásticas del CIKRON-H. *Rev. Salud Anim.* 30(1): 25-31.
6. Fernández, O.; Capdevila, J.Z.; Dalla, G. y Melchor, G. (2002): Efficacy of Rhizophora mangle bark aqueous extract in the healing of open surgical wounds. *Fitoterapia.* 73(7/8): 564-568.
7. González-Quevedo, M.; Abela, I.; Hurtado de Mendoza, J.; Larionovz, M. y López, C. (1990):

estudio Preclínico de la acción cicatrizante que ejerce sobre heridas abiertas los extractos inyectables confeccionados con dos variedades diferentes de **Aloe** que crecen en Cuba. Compendio de Investigaciones sobre Aloe barbadensis illar cultivada en Cuba. MINFAR, Instituto Superior de Medicina Militar Dr. Luis Díaz Soto. Monografía. Ciudad de la Habana: 36-48.

8. ICH (1996): Extension of the International Tripartite Guideline for Stability testing of new drug substance and products to countries of Climate Zone III and IV. ICH Harmonised Tripartite Guideline. USA-UE-JAPAN. November, 1996.

9. Melchor, Gleiby; Fernández, O.; Alvarez, Elba; Fragas, Ivis y Lobo, Evelyn (2001): Evaluación del efecto antiséptico in vivo del CIKRON-H. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 32(2): 25-32.

10. Melchor, Gleiby; Sánchez, L.M. y Armentero, M. (2000): Caducidad y vida media del CIKRON mediante estudio de envejecimiento acelerado. *Rev. Salud Anim.* 22(1): 9-12.

11. Oszmiannski, J. y Sapis, J.C. (1989): Fractionation and identification of some low molecular weight grape see phenolic. *J. Agric. Food Chem.* 37: 1293-1297.

12. Toda, M.; Okubo, S.; Hara, Y. y Shimamura, T. (1991): Antibacterial and antibactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Nippon Saikingaku Zasshi*. 46(5): 839-845.

13. Travieso, M.C.; Hechevarria, O.L.; Betancourt, A.; Frontela, M. y Miranda, I. (1998): Validación del método de determinación de taninos totales en productos naturales vegetales. *Rev. Protección Veg.* 13(2): 189-194.

(Recibido 10-12-2006; Aceptado 2-9-2007)

**CIEN AÑOS
de los estudios veterinarios en Cuba**

**GRADUADOS POR CONTINENTES
(desde 1976)**

Continentes	Graduados
África	440
América Latina y Caribe	200
Asia	11
Europa	1
Total	652