

Estabilidad del D-004 ingrediente activo en frascos de polietileno de alta densidad

Stability of D-004 active ingredient in high density polyethylene flasks

Dr. C. Eduardo Antonio Rodríguez Leyes, Dr. C. Víctor Luis González Canavaciolo, MSc. Roxana de la Caridad Sierra Pérez, Ing. Roxana Vicente Murillo, Lic. Carmen Luisa Morales Rico, Dr. C. David Marrero Delange

Centro de Productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el D-004 es un ingrediente farmacéutico activo obtenido de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*), compuesto fundamentalmente por una mezcla de ácidos grasos libres entre 8 y 18 átomos de carbono, con potencialidades en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna.

Objetivo: determinar la vida útil del D-004 en frascos de polietileno de alta densidad en las zonas climáticas IV y II.

Métodos: muestras de tres lotes pilotos de D-004, envasadas en frascos blancos de polietileno de alta densidad y protegidos por cajas de cartón, se colocaron en las condiciones de las zonas climáticas IV (30 °C/70 % HR) y II (25 °C/60 % HR). Se determinaron las características organolépticas y los contenidos de material insaponificable, ácidos grasos y microbiológicos desde el tiempo inicial hasta los 36 meses, y se determinaron gráficamente los tiempos de vida útil en ambas zonas.

Resultados: en las dos zonas climáticas el D-004 cumplió con los parámetros de estabilidad evaluados durante los primeros 33 meses, pero a los 36 meses el contenido de ácidos fue inferior al límite establecido en varias de las muestras. Los análisis de regresión permitieron determinar tiempos de vida útil del D-004 en las zonas IV y II.

Conclusiones: se demostró que el ingrediente activo D-004 que se obtuvo a escala piloto, se envasa en frascos de polietileno de alta densidad y protegido por un envase secundario (caja de cartón), presenta una vida útil de 30 y 32 meses en las zonas climáticas IV y II, respectivamente.

Palabras clave: estabilidad, D-004, polietileno de alta densidad, *Roystonea regia*.

ABSTRACT

Introduction: D-004 is a pharmaceutical active ingredient obtained from the Cuban royal palm fruits (*Roystonea regia*), mainly composed by a mixture of free fatty acids between 8 and 18 carbon atoms, potentially useful to treat benign prostatic hyperplasia.

Objective: to determine the shelf life of D-004 in high-density polyethylene flasks in climatic zones IV and II.

Methods: samples of three pilot batches of D-004, packed in white high-density polyethylene flasks and protected by cardboard boxes, were placed under conditions of the climatic zones IV (30 °C/70 % RH) and II (25 °C / 60 % RH).

Organoleptic characteristics and unsaponifiable matter, fatty acids and microbiological contents were determined from the initial time till 36 months, and shelf lives were graphically determined in both zones.

Results: in the two climatic zones, the D-004 fulfilled the tested stability parameters during the first 33 months, but at the month 36th, the acid content in several samples was lower than the set limit. The regression analyses allowed determining the shelf lives of D-004 in climatic zones IV and II.

Conclusions: it was demonstrated that the active ingredient D-004, obtained at pilot scale, packed in high density polyethylene flasks and protected by a secondary container (cardboard box), exhibits a shelf life of 30 and 32 months in the climatic zones IV and II, respectively.

Keywords: stability, D-004, high density polyethylene, *Roystonea regia*.

INTRODUCCIÓN

El D-004 es un ingrediente farmacéutico activo (IFA) obtenido de la fracción lipídica de los frutos maduros de la palma real cubana [*Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook]. Este IFA se compone fundamentalmente de una mezcla de ácidos grasos (AG) libres que contiene entre 8 y 18 átomos de carbono y son los ácidos olírico, láurico, palmítico y mirístico los componentes mayoritarios.¹ La demostrada eficacia del D-004 en modelos experimentales de hiperplasia prostática^{2,3} y en dos estudios clínicos ya culminados,^{4,5} hace prever su posible aplicación en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, una de las patologías más frecuentes en hombres mayores de 50 años.⁶

El IFA D-004, envasado en frascos de vidrio ámbar, presenta un tiempo de vida útil de 24 meses en las zonas climáticas II y IV,⁷ estabilidad que puede considerarse adecuada si se tiene en cuenta que se trata de una matriz compleja, obtenida de una fuente natural y con un considerable contenido de AG insaturados.

Sin embargo, teniendo en cuenta que su almacenaje y traslado en frascos de vidrio no es idóneo por la fragilidad de este envase, se desarrolló un estudio acelerado con frascos de varios materiales, el cual demostró la posibilidad de envasar este IFA en polietileno de alta densidad (PEAD).⁸ Atendiendo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el tiempo de vida útil del D-004 en frascos de PEAD mediante un estudio de estabilidad a largo plazo en las condiciones de las zonas climáticas II y IV.

MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo con muestras de tres lotes de D-004 obtenidos a escala piloto (300109, 090609 y 310909), envasadas en frascos blancos de PEAD con 30 mL de capacidad y tapas de rosca del mismo material. Las muestras envasadas se depositaron en cajas de cartón cerradas (envase secundario) y se colocaron bajo las condiciones de las zonas climáticas II [(25 ± 2) °C y (60 ± 5) % HR] y IV [(30 ± 2) °C y (70 ± 5) % HR].

Se realizaron muestreos de forma aleatoria al inicio y a los 6, 12, 18, 24, 27, 30, 33 y 36 meses. En cada muestreo se determinaron las características organolépticas visualmente y el contenido de material insaponificable según se describe en la USP 33.⁹ También se determinó el contenido de AG como ésteres metílicos mediante una metodología analítica por cromatografía de gases debidamente validada para los estudios de estabilidad del D-004.¹⁰ Los análisis se realizaron en un cromatógrafo GC 14A (*Shimadzu, Japón*) con detector de ionización por llama, acoplado a sistema de cómputo (*Konixbert, Barcelona, España*), con columna BPX-5 (30 m × 0,53 mm d.i. y 1,5 µm de espesor de película, *SGE, Australia*), programación: de 120 °C (2 min) a 320 °C, a 10 °C/min. Flujo del gas portador (H₂): 8 mL/min. Temperatura del detector y el inyector: 320 °C, y volumen de inyección: 1 µL en modo *split/less*. A las muestras iniciales y una vez al año se determinó el contenido microbiológico según la USP 33.⁹

Se consideró estable el IFA D-004 mientras mantuvo sus características de líquido aceitoso de color amarillo-naranja a pardo-verdoso, con 1,0–7,4 % de material insaponificable, con ≥ 85 % de AG, y ausencia de microorganismos patógenos, conteo de bacterias ≤ 1000 UFC/g y de hongos ≤ 100 UFC/g.¹

Se calcularon las medias, desviaciones estándar y coeficientes de variación de las determinaciones realizadas. Para determinar el tiempo de vida útil a partir del contenido de AG, primeramente se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) con el tiempo como covariable ($p= 0,25$) para conocer si se podían procesar los lotes de manera independiente o combinada. Las diferencias se determinaron con la prueba de *Tukey HSD*. Posteriormente se graficó la concentración de AG en función del tiempo, a partir de lo cual se determinó una ecuación matemática que describió el comportamiento observado, la que debía presentar un coeficiente de determinación (r^2) > 0,75. El tiempo de vida útil se determinó a partir del intercepto del intervalo de confianza inferior ($p= 0,05$) de la ecuación con el límite de la especificación (85 %), según recomendaciones de organismos internacionales.¹¹

RESULTADOS

En el estudio de estabilidad en la zona climática IV, el D-004 almacenado en frascos de PEAD mantuvo sus parámetros de calidad dentro de los criterios de

aceptación durante los primeros 33 meses. Aunque en los lotes 090609 y 310909 se apreciaron disminuciones en la intensidad del color y en el contenido total de AG a partir de los 12 meses, dichas variaciones no implicaron incumplimiento de las especificaciones de calidad. A los 36 meses, sin embargo, aunque los restantes parámetros de calidad cumplieron con sus correspondientes límites, el contenido de AG en los tres lotes fue inferior al 85 %, límite establecido como especificación, por lo que se detuvo el estudio. La tabla 1 muestra los contenidos individuales de AG de los lotes al inicio del estudio y a los 36 meses de almacenaje.

Tabla 1. Contenidos individuales (%) de AG en los tres lotes de D-004 envasados en PEAD, al inicio del estudio y luego de almacenados 36 meses en la zona IV

Ácido	Contenido de AG (%)					
	Lote 300109		Lote 090609		Lote 310909	
	Inicio	36 meses	Inicio	36 meses	Inicio	36 meses
C _{8:0}	0,4	0,5	0,2	0,3	0,2	0,3
C _{10:0}	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6
C _{12:0}	25,0	23,2	23,9	21,6	25,1	23,2
C _{14:0}	11,1	10,4	10,6	9,7	10,9	10,1
C _{16:1}	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
C _{16:0}	9,8	9,2	11,4	10,3	11,3	10,3
C _{18:1}	44,9	36,6	42,5	33,5	42,9	34,6
C _{18:0}	2,9	2,7	2,9	2,6	2,8	2,5

El ANCOVA aplicado a los tres lotes, empleando el tiempo como covariable, demostró que estos presentaron diferencias significativas en sus patrones de degradación ($p=0,0034$). Al aplicar la prueba de Tukey HSD, se determinó que los comportamientos de los lotes 090609 y 310 909 no se diferían estadísticamente entre sí, mientras que el del lote 300109 resultó diferente de los dos anteriores. Teniendo en cuenta lo anterior, se determinó un tiempo de vida útil a partir de los datos del lote 300 109 y otro a partir del promedio de los datos de los lotes 090 609 y 310 909. En las figuras 1 y 2 se aprecian los gráficos de la concentración de AG en función del tiempo, los polinomios que mejor describieron su comportamiento ($r^2>0,75$), así como el intercepto de los límites de confianza inferiores (95 % de probabilidad) con el límite de la especificación (85 % de contenido de AG). Con los datos del lote 300109 se obtuvo el intercepto a los 34 meses, mientras que con el promedio de los lotes 090 609 y 310 909 se obtuvo el intercepto a los 30,2 meses.

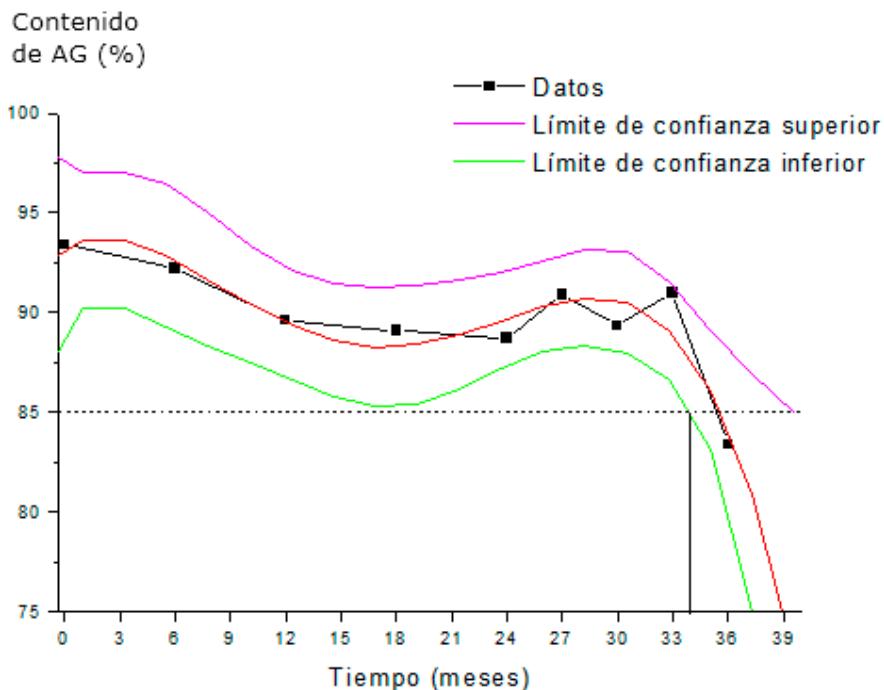


Fig. 1. Gráfico utilizado para estimar el tiempo de vida útil del D-004 almacenado en frascos de PEAD en la zona IV, a partir de los datos del lote 300109.

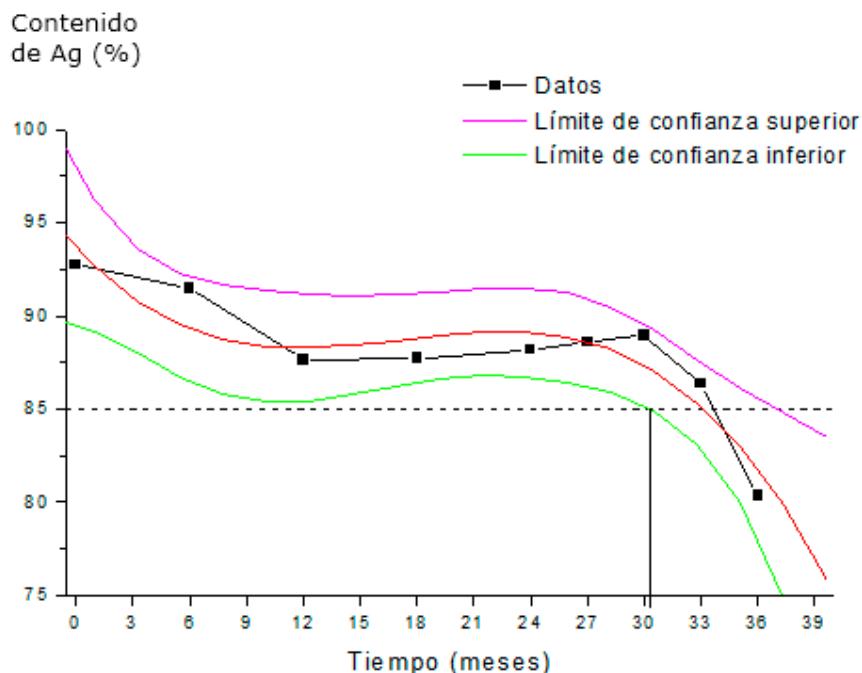


Fig. 2. Gráfico utilizado para estimar el tiempo de vida útil del D-004 almacenado en frascos de PEAD en la zona IV, a partir del promedio de los datos de los lotes 090609 y 310909.

Al almacenar al D-004 en PEAD, en las condiciones de la zona climática II, a partir de los 12 meses dos de los lotes estudiados (090609 y 310909) presentaron una ligera disminución en la intensidad del color y en el contenido total de AG (principalmente de ácido oléico), si bien los cambios observados no implicaron incumplimiento de las especificaciones de calidad durante los primeros 33 meses, tras 36 meses de almacenaje estos lotes incumplieron con el contenido de AG, por lo que el estudio se detuvo y se determinó el tiempo de vida útil a partir de sus contenidos de AG. Por su parte, el lote 300109 mantuvo sus características durante los 36 meses. La tabla 2 muestra los contenidos individuales de AG en ambos lotes, al inicio del estudio y al cabo de los 36 meses. El ANCOVA, empleando el tiempo como covariable, demostró que los dos lotes degradados presentaron un comportamiento similar en cuanto al contenido de AG ($p=0,3376$). En la figura 3 se representa la concentración promedio de AG en función del tiempo, así como el polinomio que mejor describió su comportamiento ($r^2>0,75$) y el intercepto del límite de confianza inferior (95 % de probabilidad) con el límite de la especificación (85 % de contenido de AG). El intercepto obtenido con el promedio de los lotes 090609 y 310909 fue de 32,9 meses.

Tabla 2. Contenido (%) de AG en los lotes degradados de D-004 envasados en PEAD, al inicio del estudio y luego de almacenados 36 meses en la zona II

Ácido	Contenido de AG (%)			
	Lote 090609		Lote 310909	
	Inicio	36 meses	Inicio	36 meses
C _{8:0}	0,2	0,3	0,2	0,3
C _{10:0}	0,5	0,6	0,5	0,6
C _{12:0}	23,9	22,3	25,1	23,5
C _{14:0}	10,6	10,0	10,9	10,1
C _{16:1}	0,2	0,2	0,2	0,2
C _{16:0}	11,4	10,6	11,3	10,3
C _{18:1}	42,5	34,7	42,9	34,8
C _{18:0}	2,9	2,6	2,8	2,6

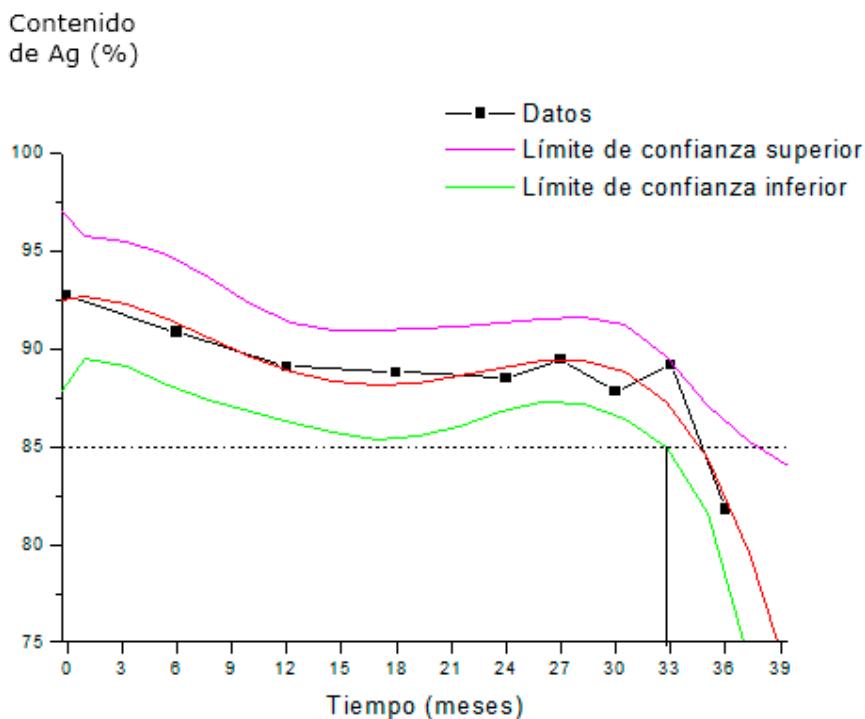


Fig. 3. Gráfico utilizado para estimar el tiempo de vida útil del D-004 almacenado en frascos de PEAD en la zona II, a partir del promedio de los datos de los lotes 090609 y 310909.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que el envasado en frascos plásticos de PEAD puede resultar una opción adecuada para este IFA. Aunque se midieron varios parámetros de calidad, el contenido de AG del D-004 representa la especificación pivote a la hora de determinar su estabilidad por estar relacionada directamente con su efecto farmacológico.¹ Por ello, el incumplimiento de dicho parámetro conllevó a detener los estudios. En ambas zonas climáticas, la disminución del contenido de AG observada a los 36 meses (tablas 1 y 2) se debió principalmente a los AG insaturados de 18 átomos de carbono, resultado lógico si se tiene en cuenta que estos son más propensos a la oxidación que los ácidos saturados presentes en el D-004.¹² Efectos similares sobre el contenido de AG insaturados también se observan en otras matrices lipídicas como el aceite de oliva en envases plásticos.¹³

Las diferencias observadas en los patrones de degradación de los lotes pudieran estar vinculadas con la presencia de compuestos minoritarios antioxidantes en el D-004, como carotenoides, tocoferoles y compuestos relacionados, cuyas concentraciones pueden variar en dependencia de la época de recolección de los frutos, tal y como sucede para otras matrices lipídicas obtenidas a partir de fuentes naturales.¹⁴

De los dos tiempos de vida útil calculados para la zona IV, uno a partir del lote 300109 y otro a partir del promedio de los lotes 090609 y 310909 (Figs. 1 y 2), se seleccionó el menor tiempo, que se aproximó a 30 meses, como la vida útil del IFA D-004 almacenado en frascos de PEAD, según recomendaciones actuales de la industria farmacéutica.^{15,16} Por otra parte, el análisis estadístico del comportamiento

promedio de los dos lotes degradados en la zona II permitió determinar un tiempo de vida útil cercano a los 33 meses (Fig. 3), el cual se approximó conservadoramente a los 32 meses. Los tiempos de vida útil determinados para ambas zonas resultan adecuados, teniendo en cuenta el alto contenido de AG insaturados en esta matriz, y son similares al tiempo de vida útil determinado para el D-004 en vidrio,⁷ por lo que el PEAD pudiera emplearse como un material alternativo para el envasado de este IFA.

Se demostró que el ingrediente activo D-004 obtenido a escala piloto, envasado en frascos de polietileno de alta densidad y protegidos por un envase secundario (caja de cartón), presenta tiempos de vida útil de 30 y 32 meses en las zonas climáticas IV y II, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez EA. Determinaciones analíticas realizadas como contribución al desarrollo de un nuevo ingrediente farmacéutico activo obtenido a partir de la palma real. Reseña tesis doctoral. Rev CENIC Ciencias Quim. 2013;44:29-32.
2. 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.
3. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. Drugs Exp Clin Res. 2005; 31(5-6):193-7.
4. Guzmán R, Illnait J, Mas R, Pérez Y, Fernández L, Mendoza S, et al. Comparative effects of *Roystonea regia* (D-004) and Saw palmetto lipid extracts on blood oxidative variables in men with benign prostate hyperplasia (BPH). IOSR PHR. 2013;3(7):1-8.
5. Guzmán R, Fragas R, Illnait J, Mas R, Fernández L, Pedroso M, Mena J, et al. Effects of *Roystonea regia* (D-004) and saw palmetto lipid extracts in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia. IOSR PHR. 2013;3(6):7-14.
6. Bhargava S, Canda AE, Chapple CR. A rational approach to benign prostatic hyperplasia evaluation: recent advances. Curr Opin Urol. 2004;14(1):1-6.
7. Sierra R, Rodríguez E, González V, Marrero D, Vicente R. Estudios preliminares de estabilidad de un extracto lipídico de los frutos de *Roystonea regia* en frascos de vidrio ámbar. Rev Cubana Farm. 2010;44(3):360-6.
8. Rodríguez E, Sierra R, González V, Marreo D, Vicente R. Estudio de estabilidad acelerada del ingrediente activo D-004 en diferentes envases. Rev Cubana Plant Med. 2009;14(3):54-60.
9. United States Pharmacopoeial Convention. USP XXXIII. The United States Pharmacopoeia Convention. Rockville: Mack Printing; 2010.

10. Rodríguez E, Marrero D, González V, Sierra R, Adames Y. Validación de un método por CG para la determinación de los ácidos grasos que componen el D-004 ingrediente activo. Rev CENIC Ciencias Quím. 2009;40(1):17-22.
11. International Conference of Harmonization. Guidance for Industry Q1E Evaluation of Stability Data. September 25, 2003.
12. Litwinienko G, Kasprzycka-G T. 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.
13. 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.
14. Bruneton J. Farmacognosia y Fitoquímica de Plantas Medicinales. 2da ed. Zaragoza: ACRIBIA S.A., 2001:160-1.
15. CECMED. Regulación 24 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos. La Habana: Minsap; 2000.
16. International Conference of Harmonization. Guidance for industry Q1A Stability Testing of New Drug Substances and Products. September 25, 2003.

Recibido: 16 de julio de 2014.

Aprobado: 8 de octubre de 2014.

Eduardo Antonio Rodríguez Leyes. Centro de Productos Naturales. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). Calle 198, s.n., e/ 19 y 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Teléfono: 271 4225.
Correo electrónico: eduardo.rodriguez@cnic.edu.cu