

Metodología analítica y estudio de estabilidad de emulsiones empleadas en ensayos de toxicología preclínica del D-004

Analytical method and stability study of emulsions used in the preclinical toxicology of D-004

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

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

RESUMEN

Introducción: en los estudios toxicológicos debe garantizarse una adecuada dosificación de las sustancias a evaluar. Es evidente la necesidad de un método analítico para las emulsiones acuosas con que se administra el D-004, ingrediente activo obtenido de la palma real (*Roystonea regia*) con usos potenciales para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna.

Objetivo: desarrollar una metodología para cuantificar el D-004 en emulsiones con dosis entre 10 y 500 mg/mL y determinar la estabilidad de dichas emulsiones.

Métodos: se extrajo el ingrediente activo con una disolución del ácido C_{13:0} (patrón interno) en n-hexano y se analizó por cromatografía de gases, previa conversión de los ácidos grasos en ésteres metílicos. El método, validado según las guías ICH, se aplicó en la determinación de la estabilidad de emulsiones de D-004, envasadas en frascos de vidrio transparente, a 25 ± 2 °C y 60 ± 5 % de humedad relativa.

Resultados: el método analítico cumplió con los criterios de validación y permitió

determinar que las emulsiones de D-004 presentan un período de vida útil de siete días en las condiciones y envase empleados en el estudio.

Conclusiones: se desarrolló y validó una metodología analítica por cromatografía gaseosa que puede ser utilizada en el control de calidad y estudios de estabilidad de emulsiones de D-004 entre 10 y 500 mg/mL.

Palabras clave: estudios toxicológicos, D-004, emulsiones, estabilidad.

ABSTRACT

Introduction: an appropriate dosage of the substances to be evaluated in toxicological studies should be ensured. It is necessary a method for the analysis of the aqueous emulsions used for the administration of D-004, an active ingredient obtained from the royal palm (*Roystonea regia*). This product could have a potential use in the treatment of benign prostatic hyperplasia.

Objective: to develop a method for the quantification of D-004 in emulsions with doses between 10 and 500 mg/mL and to determine the stability of such emulsions.

Methods: the active ingredient was extracted with a solution of the acid C_{13:0} (internal standard) in n-hexane . Then it was analyzed by gas chromatography, after the conversion of the fatty acids into methyl esters. The method, validated according to ICH guides, was used for determining the stability of D-004 emulsions, stored in clear glass flasks, at 25 ± 2 °C and 60 ± 5 % relative humidity.

Results: the analytical method met the validation criteria and allowed to determine that D-004 emulsions have a shell life of seven days under the conditions and the container employed in the study.

Conclusions: the present analytical gas chromatography method, developed and validated in this study, can be used for quality control and stability study of emulsions of D-004 between 10 and 500 mg/mL.

Key words: toxicological studies, D-004, emulsions, stability.

INTRODUCCIÓN

Las particulares características físico-químicas y las complejas composiciones de las sustancias oleosas de origen natural dificultan el desarrollo de sus estudios toxicológicos preclínicos, en los que debe garantizarse una adecuada dosificación de las sustancias a evaluar. La administración de este tipo de sustancias oleosas requiere generalmente la preparación de emulsiones acuosas. Este es el caso del ingrediente activo D-004, líquido aceitoso de color pardo oscuro obtenido a partir de los frutos de la palma real (*Roystonea regia*),¹ el cual está compuesto por una mezcla de ácidos grasos alifáticos entre 8 y 18 átomos de carbono entre los que se destacan los ácidos oleico (C_{18:0}), láurico (C_{12:0}) y mirístico (C_{14:0}). Este ingrediente activo ha mostrado

efectividad en modelos experimentales de hiperplasia prostática²⁻⁵ y una toxicidad intrínseca muy baja en los estudios de toxicología aguda, crónica y carcinogénesis.⁶⁻⁸

En estos últimos estudios se administra el D-004 en emulsiones, por lo que se hizo necesario el desarrollo y validación, según los requerimientos establecidos por las ICH,⁹⁻¹¹ de una metodología analítica para su control de calidad en concentraciones entre 20 y 300 mg/mL.¹² El empleo posterior de emulsiones con mayores concentraciones de ingrediente activo requirió la revalidación de dicha metodología para emulsiones con concentraciones entre 20 y 500 mg/mL. Esta metodología fue empleada para determinar el tiempo de vida útil de las emulsiones, según las regulaciones establecidas para este propósito en la industria farmacéutica.¹³⁻¹⁵

MÉTODOS

Equipos. Se empleó un cromatógrafo de gases modelo GC 14B (Shimadzu, Japón) con detector de ionización por llama y acoplado a un sistema de cómputo para el procesamiento de datos modelo KONIKROM 32; con columna capilar de fase enlazada BPX-5, 25 m x 0,53 mm d.i. y 0,5 µm de espesor de película. Programación: de 250-320 °C a 5 °C/min y 10 min isotérmico a la temperatura final. La velocidad lineal del gas portador (hidrógeno) fue 86,0 cm/s (11,4 mL/min). El detector y el inyector se calentaron a 320 y 300 °C respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µL.

Otros equipos: generador de hidrógeno OPGU-1500 S (Shimadzu, Japón), balanza analítica (Mettler Toledo, Suiza), termostato seco (Lab-Line Instr., USA), termómetro de -10 a 100 °C y termohigrómetro.

Reactivos. Se empleó D-004 ingrediente activo, lote 190106 (91,9 %, CNIC, Cuba), agua destilada, cloroformo comercial destilado, etanol, metanol comercial destilado y seco, n-hexano comercial destilado; tween 65, cloruro de acetilo y patrones de ácidos con 99 % de pureza: tridecanoico (C_{13:0}) octanoico (C_{8:0}), decanoico (C_{10:0}), dodecanoico (C_{12:0}), tetradecanoico (C_{14:0}), palmitoleico (C_{16:1}), palmítico (C_{16:0}), oleico (C_{18:1}), linoleico (C_{18:2}), linolénico (C_{18:3}) y esteárico (C_{18:0}) (Sigma, USA).

Disoluciones. Disolución acuosa de Tween 65 al 2 %, disolución de patrón interno: C_{13:0} 3 mg/mL en metanol, disolución metilante: cloruro de acetilo al 10 % en metanol, N-metil N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), disolución de hidróxido de sodio 2 mol/L en metanol.

Preparación de las emulsiones de D-004. Para la validación se utilizaron emulsiones madres entre 10 y 700 mg/mL, y para el estudio de estabilidad se emplearon emulsiones de 80 y 500 mg/mL. En los dos estudios se prepararon emulsiones de trabajo de 10 mg/mL a partir de las emulsiones madres.

Preparación de la muestra de ensayo. En tubos de ensayos previamente tarados se añadieron 3 mL de cada ET y se pesaron. A cada tubo se añadió 1 mL de disolución de patrón interno, 7 mL de n-hexano y 3 mL de etanol. Se agitó en zaranda durante 30 min. Se dejó reposar hasta que se separaron las fases. Se trajeron 5 mL de la fase orgánica (superior) hacia otro tubo de ensayos y se añadieron 2 mL de DM. Se selló herméticamente el tubo y se colocó en el termostato seco a 85 °C durante 30 min, con

agitación vigorosa cada 10 min. Se sacó del termostato, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se separaron las fases. Se añadieron 3 mL de la disolución de NaOH. Se agitó en la zaranda durante 15 min. Se extrajo una alícuota de 2 mL de la fase orgánica (superior) hacia un vial de 4 mL. Se procedió al análisis por cromatografía gaseosa.

Procedimiento de cuantificación. Se utilizó el ácido tridecanoico ($C_{13:0}$) como patrón interno, tanto para la identificación (tiempos de retención) como para la cuantificación (determinación de la masa de ácido láurico) por CG capilar.¹²

Aplicabilidad del sistema. Se realizaron seis réplicas de inyección de una muestra, y a partir de los cromatogramas obtenidos se determinó la repetibilidad de la inyección, dada por el CV (%) de la determinación cuantitativa ($n= 6$), la que debía ser $< 0,5\%$.⁹⁻¹¹

Linealidad. El estudio contó de 6 puntos ($n= 3$), correspondientes a emulsiones madres con concentraciones de 10, 100, 200, 300, 500 y 700 mg/mL, a las cuales se les aplicó la metodología analítica descrita anteriormente. El cálculo de la ecuación de regresión y el coeficiente de correlación se realizó mediante el programa Statistica para Windows, en el que se analizaron las concentraciones calculadas a partir de los cromatogramas (y) en función de las concentraciones teóricas de las emulsiones (x). Como criterios de linealidad se consideraron el coeficiente de correlación ($r \geq 0,99$); el coeficiente de variación de los factores de respuesta $\leq 5\%$; la desviación estándar relativa de la pendiente $\leq 2\%$; y que el cero quedara incluido en los límites de confianza del intercepto para un 95 % de confiabilidad.⁹⁻¹¹

Exactitud. Se determinó en tres puntos del estudio de linealidad del método (concentraciones de 10, 200 y 500 mg/mL). Los recobrados obtenidos se compararon con el 100 % mediante la prueba t de Student para un 95 % de confianza.⁹⁻¹¹

Estudio de estabilidad. Se prepararon emulsiones a dos concentraciones: 80 y 500 mg/mL, y se colocaron en las condiciones de trabajo del laboratorio (25 y 60 % HR).¹³⁻¹⁵ La frecuencia de los muestreos fue al inicio y a los 7, 10 y 15 días. En el tiempo inicial del estudio y durante los diferentes muestreos se determinó la concentración de D-004 en cada emulsión según la técnica validada. Se aplicó la prueba t de Student para muestras dependientes, en la que se compararon las concentraciones de D-004 en cada tiempo con la inicial. Los niveles de significación estadística se establecieron para $p= 0,05$ con corrección de Bonferroni ($p= 0,017$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete de programas Statistica 5.0 para Windows. Como criterio de aceptación se consideró que no existieran diferencias significativas entre las concentraciones de D-004 al tiempo cero y en los diferentes tiempos.

RESULTADOS

Aplicabilidad del sistema. El CV de la determinación cuantitativa fue 0,17 %.

Linealidad del método. La ecuación de regresión obtenida en el ensayo de linealidad fue: $y = (0,93 \pm 0,03) x - (5,78 \pm 11,76)$, con límites de confianza calculados para p

= 0,05. El coeficiente de correlación fue de 0,999; el CV de los factores de respuesta 3,07 % y la DE relativa de la pendiente 1,77 %.

Exactitud. Para tres puntos del estudio de linealidad, se calculó la concentración y el recobrado ([tabla 1](#)). Los recobrados obtenidos estuvieron alrededor de 98 % y las $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ (4,303) para un 95 % de confiabilidad.

Tabla 1. Resultados del estudio de exactitud

Punto	Concentración		Recobrado promedio (%)	t_{exp}
	Teórica	Calculada		
I	10,768	10,653	98,938	1,959
II	236,310	320,135	98,108	2,883
III	544,220	538,405	98,143	2,387

Estudio de estabilidad

Los resultados del estudio de estabilidad de emulsiones con 80 y 500 mg/mL se muestran en la [tabla 2](#). Como se aprecia, el comportamiento fue similar para ambas, en las que se observó una disminución significativa del contenido de D-004 a los 10 días, la cual se confirmó al cabo de los 15 días, para niveles de significación estadística de $p= 0,05$ con corrección de Bonferroni ($p= 0,017$). El comportamiento general de los ácidos láurico y oleico en las emulsiones estudiadas se puede observar en la [figura](#), expresado a través de las relaciones de áreas cromatográficas AG/patrón interno (PI). La degradación fue mayor para el oleico que para el láurico, dado que a los 10 días el primero disminuyó en un 5,7-10,7 % con relación al contenido inicial, mientras que el segundo lo hizo en un 4,9-5,2 %. A los 15 días, el oleico disminuyó en un 12,8-13,2 % y el láurico en un 7,3-9,4 %.

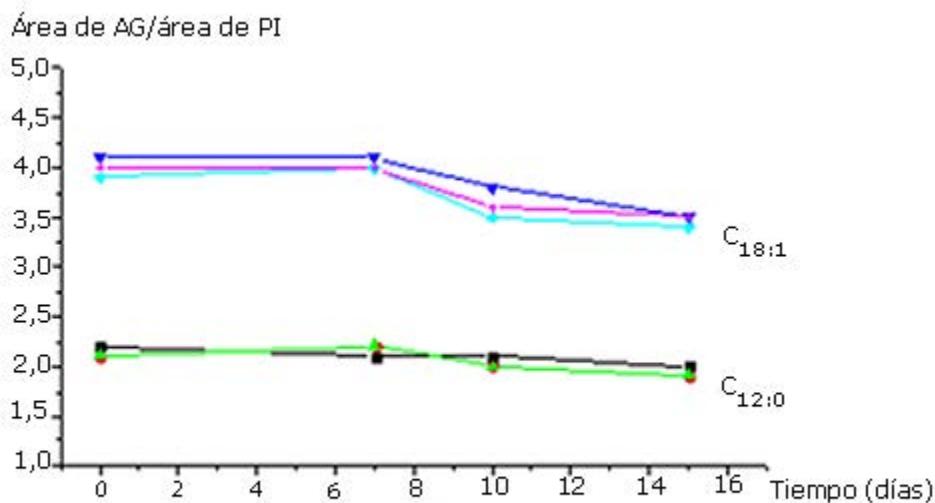


Fig. Comportamiento en el tiempo de los ácidos C_{12:0} y C_{18:1} en las emulsiones estudiadas.

DISCUSIÓN

Validación

Como parte de los ensayos de validación no se realizaron estudios de especificidad ni precisión, ya que estos habían sido efectuados en la validación de la versión anterior del método de análisis.¹² Los CV obtenidos en el ensayo de linealidad, no obstante, coinciden con los obtenidos en la validación previa,¹² lo cual confirma que el método también es preciso en el intervalo actual de concentraciones.

Aplicabilidad del sistema. El CV obtenido en la determinación cuantitativa cumplió con el límite establecido (0,5 %), por lo que el sistema se encontraba en condiciones de ser utilizado para la realización del resto de los ensayos.

Linealidad del método. El coeficiente de correlación obtenido indicó la existencia de una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9 %. En la prueba de linealidad se encontró que tanto el CV de los factores de respuesta como la DE relativa de la pendiente fueron menores que los límites de aceptación establecidos ($\leq 5\%$ y $\leq 2\%$, respectivamente) y mediante la prueba de proporcionalidad se pudo comprobar que no existía sesgo, pues el intervalo de confianza del intercepto incluye el cero, por lo que se puede afirmar que el método es lineal y proporcional en todo el intervalo de concentraciones estudiado (entre 10 y 700 mg/mL), el cual fue escogido teniendo en cuenta que en los estudios preclínicos se emplean emulsiones entre 20 y 500 mg/mL.

Exactitud. Los recobrados obtenidos en los tres puntos evaluados implicaron $t_{exp} < t_{tab}$ para un 95 % de confiabilidad, por lo que se pudo afirmar que no existían diferencias significativas entre los recobrados promedio y el 100 %, por lo tanto el método es exacto.

Estudio de estabilidad

Los resultados del estudio de estabilidad fueron similares para ambas emulsiones, en los que se observó una disminución significativa del contenido de D-004 a los 10 días, la cual se confirmó al cabo de los 15 días. Teniendo en cuenta que varios de los ácidos grasos (AG) que componen el D-004 también se encuentran en el Tween 65 (agente emulgente empleado) como hallamos en el estudio de especificidad,¹² no resulta posible la determinación de todos los AG que componen dicho ingrediente activo; sin embargo, sí es posible determinar los contenidos de láurico y oleico, lo cual puede ser empleado para conocer el comportamiento de los AG saturados e insaturados de la mezcla. El comportamiento de estos AG en las emulsiones estudiadas muestra que hubo una disminución en el contenido de ambos, aunque la degradación fue mayor para el oleico que para el láurico, comportamiento que resulta lógico teniendo en cuenta que los AG insaturados son más susceptibles a la degradación.

En conclusión, se revalidó una metodología analítica por cromatografía gaseosa en un nuevo intervalo de concentraciones, la cual resultó lineal, exacta y precisa, por lo que puede ser utilizada en el control de calidad de las emulsiones entre 20 y 500 mg/mL. Los resultados del estudio de estabilidad permiten establecer para las emulsiones de

D-004 un tiempo de vida útil de 7 días, si estas son envasadas en frascos de vidrio transparente y conservadas a 25 ± 2 °C y 60 ± 5 % HR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Laguna A, Rodríguez E, Mas R, Carvajal D, Arruzazabala ML, Molina V, et al. Extracto obtenido a partir de frutos maduros de *R. regia* utilizado contra la hiperplasia prostática y la prostatitis, Patente de invención No. 23256, Cuba, Nov., 2007.
2. Arruzazabala ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, González V, Rodríguez E. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruits, on prostate hiperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res.* 2004; 30: 227-33.
3. Carbajal D, Arruzazabala ML, Más R, Molina V, Rodríguez EA, González VL. 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: 505-14.
4. Carbajal D, Molina V, Mas 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: 193-7.
5. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, Noa M, Carbajal D, Mendoza N. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R D.* 2006; 7: 233-41.
6. Gámez R, Mas R, Noa M, Menéndez R, García H, Rodríguez Y, et al. Oral acute and subchronic toxicity of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, in rats. *Drugs Under Res & Dev.* 2005; 31(3): 101-8.
7. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Goicochea E, et al. Toxicología aguda del D-004. *Rev CENIC Cien Biol.* 2007; 38(2): 99-102.
8. Gutiérrez A, Gámez R, Mas R, Noa M, Pardo B, Marrero G, et al. Oral subchronic toxicity of a lipid extract from *Roystonea regia* fruits in mice. *Drugs Chem Toxicol.* 2008; 31: 217-28.
9. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use-ICH-Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q2B, Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on 6 November 1996 by the ICH Steering Committee, Nov., 1996.
10. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación No. 41-2007. Directrices sobre validación de métodos analíticos. La Habana: MINSAP; 2007.
11. Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. J AOAC. 1982; 65: 525-30.

12. Sierra R, Rodríguez E, González V, Marrero D, Vicente R, Velázquez C. Desarrollo y validación de un método por CG para la determinación de D004 en emulsiones. Rev CNIC Cien Quím. 2008;39(3):122-5.
13. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación No. 24-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos. La Habana: MINSAP; 2000.
14. The European Agency for the evaluation of Medicinal Products-EMEA. Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related products, CPMP/QWP/576/96 Rev 1, EMEA/CVMP/373/04, London, May 19, 2005.
15. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use-ICH-Harmonized Tripartite Guideline Guidance for Industry. Evaluation of Stability Data. Topic Q1E, Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH by the ICH Steering Committee, Nov., 2003.

Recibido: 7 de junio de 2012.

Aprobado: 16 de julio de 2012.

Roxana de la Caridad Sierra Pérez. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ave. 25 y Calle 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. Correo electrónico: roxana.sierra@cnic.edu.cu

Tabla 2. Resultados del estudio de estabilidad de emulsiones de D-004 (80 y 500 mg/mL) a 25 ± 2 °C y 60 ± 5 % HR.

Concentración inicial (mg/mL)	Tiempo (días)	Concentración determinada (mg/mL)		
		Emulsión 1	Emulsión 2	Emulsión 3
80	Inicio	78,6	74,2	76,4
	7	78,5	74,0	76,2
	10	74,5*	70,7*	72,6*
	15	71,8*	67,5*	69,6*
500	Inicio	491,0	463,7	477,4
	7	490,6	462,3	476,5
	10	465,9*	441,7*	453,8*
	15	448,5*	421,7*	435,1*

* Diferencias significativas para $p < 0,017$.

[Regresar](#)