

# ESTIMACIÓN DEL PLAZO DE VALIDEZ EN CONDICIONES NO ISOTÉRMICAS: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

*Alexis Oliva, Marta Hidalgo, Cristo Álvarez, Matías Llabrés, José B. Fariña*

*Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,  
Universidad de La Laguna, 38200, La Laguna, Tenerife, España.*

## Resumen / Abstract

Nonisothermal prediction of drug stability based on direct nonlinear estimation of the shelf-life was compared with the isothermal approach. The reliability of the statistics for the estimates of the shelf-life and activation energy obtained by the two methods was evaluated. The estimates obtained by the isothermal method were somewhat more accurate and precise than those obtained by the nonisothermal method. The results showed that in each of the heating programs, the estimates are more accurate and precise by increasing the extent of drug degradation, changing temperature range, though not by sampling frequency. The nonisothermal method needed suitable experimental designs and precise assay methods of drug contents to provide reliable parameter estimates.

## Introducción

Los ensayos acelerados en condiciones no isotérmicas han sido utilizados para estimar el plazo de validez de numerosos fármacos dado que permiten reducir la cantidad de producto, el tiempo de análisis y el volumen de muestras a analizar con respecto a los ensayos acelerados isotérmicos tradicionales. Varios métodos de análisis, tanto lineales como no lineales, han sido desarrollados para estimar los parámetros de la ecuación de Arrhenius en condiciones no isotérmicas, sin embargo, se ha prestado muy poca atención a la precisión de los parámetros estimados, de modo que un aumento de la incertidumbre en las estimadas podría cuestionar las ventajas derivadas de la reducción

experimental que conllevan los ensayos no isotérmicos [1].

El objetivo del presente trabajo se centró en evaluar el efecto de las condiciones experimentales de los ensayos no isotérmicos sobre la precisión de los parámetros, plazo de validez ( $t_{90\%}$ ) y la energía de activación ( $E_a$ ) en función del intervalo de temperaturas, duración del ensayo y frecuencia de muestreo. Para ello se utilizó el fragmento 26-33 de la colecistoquinina (CCK-8) como molécula modelo.

## Teoría

La velocidad de degradación de un fármaco para una cinética de primer orden puede expresarse como:

$$C = C_0 \exp[-tA \exp(-E_a/RT)] \quad (\text{Ec.1})$$

donde  $C_0$  y  $C$  son las concentraciones a tiempo cero y tiempo  $t$ , respectivamente, y  $E_a$  y  $A$  son la energía de activación y factor de frecuencia de la ecuación de Arrhenius. El factor  $A$  se relaciona con el plazo de validez de acuerdo con la ecuación 2:

$$A = (0.1054/t_{90\%}) \exp(EA/R298) \quad (\text{Ec.2})$$

Por otra parte, la velocidad de degradación de un fármaco en condiciones no isotérmicas puede expresarse como:

$$C = C_0 \exp(-AI)$$

$$I = \int_0^t \exp[-E_a/R \cdot T(t)] dt \quad (\text{Ec. 3})$$

donde  $T(t)$  es la variación de la temperatura absoluta con el tiempo. Sustituyendo la ecuación 2 en la ecuación 3, se obtiene la ecuación 4:

$$C = C_0 \exp\left[-0.1054 \exp\left(\frac{Ea}{R298}\right) I / t_{90\%}\right]$$

(Ec. 4)

## Materiales y Métodos

### Materiales

Se utilizó el fragmento 26-33 de la colecistoquinina (CCK-8) suministrada por Sigma (Lote: 062K09561). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

### Método analítico

Se utilizó un equipo de cromatografía de Waters (Milford, MA, USA) on una columna Nova-Pack C-18 y un detector UV-Vis. El control, adquisición y análisis de datos se realizó utilizando el programa Millennium 32<sup>®</sup>. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo/agua (30:70, v/v) con un 0,05% de trifluoroacético a un flujo de 1,0 mL/min. La longitud de onda fue de 280 nm siendo el volumen de inyección de 50 µL. El método analítico fue validado de acuerdo con las normas propuestas por la Guía ICH [2].

### Ensayos acelerados no isotérmicos

Se utilizó una estufa Heraeus (Modelo BR6000) que permite el control de temperaturas a través de una interfase RS232. La variación de la temperatura de la estufa así como la adquisición de datos de la evolución de ésta con el tiempo se realizó utilizando un PC con un programa desarrollado en TestPoint<sup>®</sup> 4.0 que permite, entre otras funciones, un incremento lineal de la temperatura con el tiempo.

La figura 1 recoge los diferentes programas lineales de incremento de la temperatura con el tiempo utilizados.

### Ensayos acelerados isotérmicos

Las muestras fueron almacenadas en una estufa Heraeus (Modelo BR6000) a temperaturas comprendidas entre 40 y 70 °C con variaciones inferiores a 0,1 °C.

### Tratamiento de las muestras

La CCK-8 se disolvió en dimetilsulfóxido y se diluyó convenientemente con NaOH 0,01M para obtener una concentración final de 0,1mg/mL. A intervalos apropiados de tiempo, se tomaron 50 µL de muestra y se diluyeron apropiadamente con fase móvil para su posterior análisis cromatográfico. El proceso se llevo a cabo por triplicado.

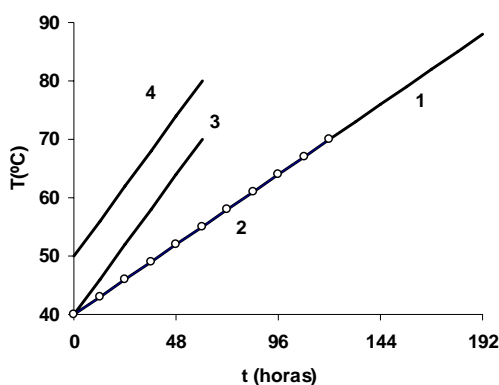


Figura 1. Programas lineales de incremento de la temperatura con el tiempo utilizados en los ensayos acelerados en condiciones no isotérmicas.

### Análisis de datos

Para la resolución de la ecuación 4 se utilizó el programa Mathematica<sup>®</sup> [23] aplicando la siguiente subrutina:

"Estimación del plazo de validez y energía de activación: Condiciones no isotérmicas"

% Parámetros:

%T = temperatura; %Tini = temperatura inicial;

% v = velocidad de calentamiento; % t = tiempo;

% Ea =Energía de activación; % t90 = plazo de validez, estimado a 25°C, i.e, 298°K;

% R = Constante universal de los gases;

```
Remove["Global`*"]
```

```
T=Tini+v.t;
```

```
fun[Co_, Ea_, t90_, Tini_,v_, tf_]=
```

```
Co*exp[-I(0.1054/t90*Exp[Ea/RT])*
```

```
Integrate[Exp[-Ea/(RT)], {t, 0, tf}]
```

```
datos= {{0., 100.},
```

```
{192., ..}};
```

```
TableForm[datos, TableHeadings->
```

```
{None, {"-t-", "-c-"}];
```

```
<< Statistics`NonLinearFit`
```

```
 analisis = NonlinearRegress[datos, fun[Co, Ea, t90, 313.15,
```

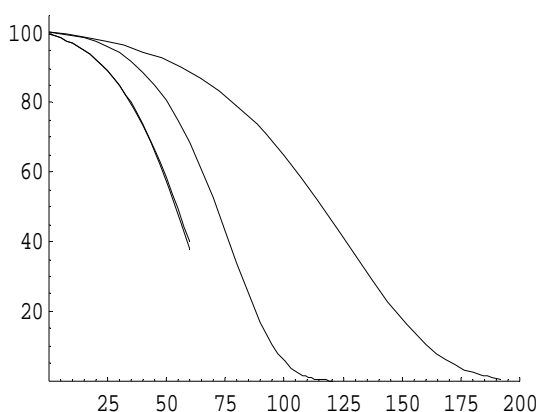
```
0.25, t], t, {{Co, {97., 102}}, {{t90, {0.1., 500}}, {{Ea, {10000.,
```

## Resultados y Discusión

La figura 2 muestra la variación del porcentaje remanente de la CCK-8 frente al tiempo para

cada uno de los programas de incremento de temperatura utilizados.

En primer lugar se evaluó el efecto de la frecuencia de muestreo sobre la precisión de la  $E_a$  y  $t_{90\%}$  estimados, empleándose diferentes frecuencias de muestreo (ver tabla 2) utilizando como referencia los datos obtenidos con el programa de calentamiento número 1. En la tabla 2 se recogen los valores estimados de la  $E_a$  y  $t_{90\%}$  en función de la frecuencia de muestreo para dicho programa.



**Figura 2.** Variación del % remanente de la CCK.8 frente al tiempo para los diferentes programas de calentamiento (De izquierda a derecha: 3, 4, 2, 1).

**Tabla 2.** Diferentes frecuencias de muestreos utilizadas para evaluar su efecto sobre la precisión de las estimadas de  $E_a$  y  $t_{90\%}$  para el programa de calentamiento 1.

t (h)	Diseño			
	# 1	# 2	# 3	# 4
0	X	X	X	X
2	X		X	
24	X	X	X	
36	X			
48	X	X		X
60	X		X	X
72	X	X		
84	X			X
96	X	X	X	X
108	X			X
120	X	X		
132	X		X	X
144	X	X		X
156	X			
168	X	X	X	
180	X		X	
192	X	X	X	X
n	17	9	9	9

Independientemente del diseño utilizado, el  $t_{90\%}$  estimado fue superior al obtenido en condiciones isotérmicas, aunque no se observaron grandes diferencias entre los distintos diseños. Sin embargo el diseño # 4, que incluye un mayor número de puntos en la fase central de la degradación, presentó la menor varianza, pero el  $t_{90\%}$  estimado fue el más elevado. Una situación similar se observó para la Energía de activación.

**Tabla 2.** Valores estimados de  $E_a$  y  $t_{90\%}$  y sus intervalos de confianza del 95% (entre paréntesis) en función de la frecuencia de muestreo.

	$t_{90\%}$ (h)	$E_a$ (Kcal/mol)
Diseño 1	1002[921-1085]	24,1[23,7-24,5]
Diseño 2	972[847-1098]	23,9[23,3-24,6]
Diseño 3	1031[962-1100]	24,2[23,9-24,6]
Diseño 4	1130[1069-1190]	24,7[24,4-25,0]

La tabla 3 recoge los valores de la  $E_a$  y  $t_{90\%}$  estimados, con sus respectivos intervalos de confianza, para los diferentes programas no isotérmicos utilizados de acuerdo con la figura 1.

**Tabla 3.** Valores estimados de  $E_a$  y  $t_{90\%}$  para los diferentes programas de calentamiento.

Programa	$t_{90\%}$ (h)	$E_a$ (Kcal/mol)	%Degr.	t (horas)
# 1	1003	24,1	1,50	192
# 2	885	22,3	46,4	120
# 3	1301	24,6	40,0	60
# 4	307	23,3	40,8	60
Isotérmicas	941	24,5	35%	-

La precisión y exactitud de las estimadas de la  $E_a$  y  $t_{90\%}$  se incrementan cuanto mayor sea el intervalo de temperatura, siempre que se cumpla la ecuación de Arrhenius en el mismo y la degradación del fármaco sea máxima, caso del programa # 1, siendo el error con respecto a las estimadas en condiciones isotérmicas del 6,6% en el caso del  $t_{90\%}$  frente a un 1,66% para la  $E_a$ . Comparando los ensayos realizados con los programas # 3 y # 4, que presentan las mismas condiciones, excepto que la temperatura de inicio fue de 40°C y final de 70°C (# 4) y de 50 a 80°C (# 3), los  $t_{90\%}$  estimados son muy dispares, a pesar de que el porcentaje de fármaco

degradado fue aproximadamente el mismo. En principio cabe esperar que la  $E_a$  y  $A$  sean similares ya que ambos parámetros son independientes de la temperatura de acuerdo con Arrhenius, sin embargo no ocurre así, especialmente, en el caso del factor de frecuencia,  $A$ , siendo 10 veces superior para el programa #3. Una posible explicación a este resultado es que ambos parámetros,  $E_a$  y  $A$ , están fuertemente correlacionados, hecho reflejado en la matriz varianza-covarianza, de forma que pequeños errores experimentales de la concentración afectan enormemente a las estimadas de la  $E_a$  y  $A$ , lo que condiciona el valor del  $t_{90\%}$ .

## Bibliografía

1. X. Zhan, G. Yin, L. Wang, B. Ma. Exponential Heating in Drug Stability Experiment and Statistical Evaluation of Nonisothermal and Isothermal prediction. J. Pharm. Sci., 86, 709, (1997).
2. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures Methodology (ICH-Q2B), November, 1996.
3. S. Wolfram. Mathematica: A System for Doing Mathematics by computer. AddisonWesley, Redwood City, California, 1988.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno Autónomo de Canarias (Proyecto: 072/2001)

### **Autor de contacto:**

*Nombre y apellidos: Alexis Manuel Oliva Martín*

*e-mail: amoliva@ull.es*

*Institución: Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna*

*Dirección: Avenida Fco. Sánchez, s/n, 38200*

*Ciudad: La Laguna, Tenerife*

*Telf.: 922-318-452*

*Fax: 922-318-506*