

Estudio de la estabilidad física, química y microbiológica de una preparación extemporánea a base de maleato de enalapril

Javier Enrique Ariza Paba ^a, Bibiana Margarita Vallejo Díaz ^b, Clara Eugenia Plazas Bonilla ^c, Helber de Jesús Barbosa Barbosa ^{d*}

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, D. C., Colombia

Correos electrónicos: ^a jearizap@unal.edu.co, ^b bmvallejod@unal.edu.co, ^c ceplazasb@unal.edu.co, ^d hdbarbosab@unal.edu.co

*Autor correspondiente.

Recibido: 30 de septiembre de 2021

Revisado: 25 de enero de 2024

Aceptado: 26 de enero de 2024

RESUMEN

Introducción: Durante el diseño y formulación de formas farmacéuticas, o en caso de alguna transformación por la necesidad de ajustar la dosis o adecuarlo al estado del paciente, es necesario verificar las características químicas, físicas y biológicas de todos los componentes que harán parte de la formulación del producto final. Lo anterior con el fin de garantizar que la preparación sea estable, eficaz, segura, fácil de administrar y bien tolerada. **Objetivo:** Estudiar las propiedades físicas y químicas de una preparación extemporánea líquida de maleato de enalapril para administración peroral, elaborada a partir de tabletas comercialmente disponibles en el mercado colombiano, haciendo uso de prácticas comunes en los centros hospitalarios para su preparación. **Materiales y métodos:** Como vehículos se utilizaron: una solución en proporción 1:1 de dextrosa en agua al 5% y agua destilada (vehículo 1) y una solución de la misma composición del vehículo 1 ajustada a pH 3,0 con ácido ascórbico (vehículo 2). Las muestras se envasaron en frascos ámbar o transparentes y se almacenaron a 5 ± 2 °C y 25 ± 2 °C durante 360 horas. El maleato de enalapril se cuantificó a las 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 y 360 horas, usando una metodología validada, la cual demostró ser selectiva, lineal, precisa y exacta. **Resultados:** Los resultados indican que el pH es un factor que afecta el tiempo de vida útil de las preparaciones líquidas extemporáneas de maleato de enalapril.

La estabilidad de la preparación extemporánea se conservó hasta 240 horas usando el vehículo 1 y almacenándola a una temperatura de 5 ± 2 °C en frasco ámbar.

Palabras clave: maleato de enalapril, propiedades fisicoquímicas, preparación extemporánea, estabilidad.

SUMMARY

Study of the physical, chemical and microbiological stability of an extemporaneous preparation based on enalapril maleate

Introduction: During the design and formulation of pharmaceutical forms, or in case of any transformation due to the need to adjust the dose or adapt it to the patient's condition, it is necessary to verify the chemical, physical and biological characteristics of all the components that will be part of the formulation in the final product. The above in order to ensure that the compounding it is stable, effective, safe, easy to administer and well tolerated. **Objective:** To study the physical and chemical properties of an extemporaneous (compounding) liquid preparation of enalapril maleate for peroral administration, prepared from tablets commercially available in the Colombian market, using common practices in hospital centers for its preparation. **Materials and methods:** The following were used as vehicles: a 1:1 solution of dextrose in 5% water and distilled water (vehicle 1) and a solution of the same composition of vehicle 1 adjusted to pH 3.0 with ascorbic acid (vehicle 2). Samples were packaged in amber or transparent bottles and stored at 5 ± 2 °C and 25 ± 2 °C for 360 hours. Enalapril maleate was quantified at 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 and 360 hours, using a validated methodology, which proved to be selective, linear, precise and exact. **Results:** The results indicate that pH is a factor that affects the shelf life of extemporaneous liquid preparations of enalapril maleate. The stability of the extemporaneous preparation was preserved up to 240 hours using vehicle 1 and storing it at a temperature of 5 ± 2 °C in an amber bottle.

Keywords: enalapril maleate, physicochemical properties, extemporaneous preparation, stability.

RESUMO

Estudo da estabilidade física, química e microbiológica de uma preparação extemporânea à base de maleato de enalapril

Introdução: Durante o desenho e formulação de formas farmacêuticas, ou em caso de qualquer transformação devido à necessidade de ajuste de dose ou adaptação à condição do paciente, é necessário verificar as características químicas, físicas e biológicas de todos os componentes que farão parte da formulação do produto final. Tudo isto para garantir que a preparação é estável, eficaz, segura, fácil de administrar e bem tolerada. **Objetivo:** Estudar as propriedades físicas e químicas de uma preparação líquida extemporânea de maleato de enalapril para administração peroral, preparada a partir de comprimidos comercialmente disponíveis no mercado colombiano, utilizando práticas comuns em centros hospitalares para sua preparação. **Materiais e métodos:** Foram utilizados como veículos: uma solução 1:1 de dextrose em 5% de água e água destilada (veículo 1) e uma solução de mesma composição do veículo 1 ajustada para pH 3,0 com ácido ascórbico (veículo 2). As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar ou transparentes e armazenadas a $5\pm 2^\circ\text{C}$ e $25\pm 2^\circ\text{C}$ por 360 horas. O maleato de enalapril foi quantificado nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 e 360 horas, utilizando metodologia validada, que se mostrou seletiva, linear, precisa e exata. **Resultados:** Os resultados indicam que o pH é um fator que afeta o prazo de validade das preparações líquidas extemporâneas de maleato de enalapril. A estabilidade da preparação extemporânea foi preservada por até 240 horas utilizando o veículo 1 e armazenando-a à temperatura de $5\pm 2^\circ\text{C}$ em frasco âmbar.

Palavras-chave: maleato de enalapril, propriedades físico-químicas, preparação extemporânea, estabilidade.

INTRODUCCIÓN

Para realizar el diseño y formulación de formas farmacéuticas es necesario verificar las características químicas, físicas y biológicas de todos los componentes que harán parte de la formulación del producto, considerando tanto los ingredientes activos como los excipientes. Todos estos deben ser compatibles entre sí con el fin de garantizar que el producto farmacéutico sea estable, eficaz, seguro, fácil de administrar y bien tolerado.

Otro aspecto que se debe considerar durante el diseño y formulación de medicamentos es la edad del paciente: un adulto, un niño o un neonato tienen grandes diferencias

fisiológicas, por lo que las dosis de administración de un fármaco para estos pacientes suelen ser diferentes. Algunas formas farmacéuticas que se encuentran en el mercado no son muy prácticas para usarlas en niños, neonatos y personas de la tercera edad, porque han sido diseñadas para personas adultas y los requerimientos de dosis para estos pacientes varían según su peso corporal o área superficial. Además, se debe tener en cuenta que los bebés y usualmente niños menores de 5 años son incapaces de tragar o deglutir una forma farmacéutica sólida, como lo son las tabletas y cápsulas; requiriéndose para estos pacientes formas farmacéuticas líquidas en lugar de las sólidas. De esta manera una preparación líquida podría ser útil para la administración peroral de fármacos en infantes, niños y personas de la tercera edad pues sería posible ajustar la dosis del fármaco variando el volumen administrado. Sin embargo algunos fármacos no suelen ser estables por mucho tiempo en un medio líquido, situación que explica la razón por la cual estos fármacos no se encuentran comercializados en esta forma farmacéutica.

La acción más frecuente para manejar la prescripción en lactantes, en los centros hospitalarios, es realizar la trituración de una forma de dosificación disponible (tabletas, cápsulas) hasta la obtención de un polvo fino y mezclar con un líquido, quedando generalmente en forma de suspensión. En pacientes jóvenes se prefiere mezclar el polvo con alimentos líquidos para enmascarar su sabor amargo [1, 2]. Estas técnicas de administración hospitalaria pueden llevar a una imprecisión en la dosificación del fármaco administrado, teniendo además inconvenientes relacionados con el desconocimiento de la estabilidad de la preparación en los medios líquidos utilizados.

Debido a estas necesidades que se presentan en los hospitales, el farmacéutico busca elaborar una preparación extemporánea líquida, para administración peroral a partir de tabletas o cápsulas, utilizando como medio de transporte del fármaco, soluciones manejadas en el ámbito hospitalario como son: la solución salina, la solución de dextrosa entre otras, sin garantizar la estabilidad de dicha preparación. Por lo tanto, durante la transformación son parámetros a considerar: la solubilidad y estabilidad del fármaco, el pH y la composición del medio de suspensión [1].

Los fármacos en preparaciones extemporáneas líquidas pueden sufrir reacciones químicas que llevan a la degradación, entre las que se encuentran reacciones de hidrólisis, oxidación o reducción. El pH y otros factores pueden influir en la velocidad o el tipo de reacción; por ejemplo, esta degradación química generalmente aumenta con la temperatura, siendo una condición a tener en cuenta en los ensayos de estabilidad acelerada. Es importante evaluar el cambio de color, olor y pH, que pueden ser una manifestación de inestabilidad fisicoquímica y a su vez se debe observar si se presenta sedimentación de los fármacos que puedan causar dificultad en la redispersión de la formulación. Por otro lado, el crecimiento microbiano en la preparación puede causar mal olor y turbi-

dez, afectando notablemente su apariencia y estabilidad, además puede conducir a un cambio de pH de la formulación y así reducir la estabilidad química y solubilidad del fármaco como consecuencia de los subproductos del metabolismo microbiano. Esto hace que sea necesario contar con un área limpia, materias primas y envases que garanticen la estabilidad microbiológica adecuada para la preparación [3, 4].

Es así como estas propiedades físicas, químicas y microbiológicas juegan un papel fundamental en la estabilidad de la preparación extemporánea. Es importante resaltar que la estabilidad, entendida como la conservación dentro de límites especificados durante el periodo de almacenamiento y utilización de las propiedades y características que presentaba cuando se elaboró, será de días e incluso horas para el caso particular de las preparaciones extemporáneas; sin embargo, se considera un tiempo adecuado y suficiente para satisfacer las necesidades terapéuticas de un paciente que requiere de la adecuación de una forma farmacéutica, [5-8].

Por tal razón, surge el propósito del presente estudio: preparar una forma de dosificación líquida peroral extemporánea de maleato de enalapril con vehículos de fácil acceso. En pediatría el enalapril es uno de los fármacos más ampliamente utilizados en cardiología [9], se emplea para el tratamiento de la hipertensión esencial y renovascular y en la insuficiencia cardíaca congestiva [1]. En Colombia, el maleato de enalapril se encuentra disponible en tabletas de 5, 10 y 20 mg, no encontrándose suspensiones comercialmente disponibles para administración peroral que puedan ser usadas para tratar a niños o ancianos que no pueden tragar o deglutir las tabletas [10].

Aunque se han realizado estudios para asegurar la estabilidad de preparaciones extemporáneas, algunos de estos trabajos han utilizado vehículos que son comerciales y para los hospitales, especialmente aquellos de niveles I y II, no existe facilidad para su adquisición. Para garantizar que los hospitales puedan elaborar la preparación extemporánea, se han considerado como los vehículos seleccionados, aquellos de uso frecuente en estas instituciones; ya que el empleo de otros medios, aunque logren brindar estabilidad a la preparación líquida de maleato de enalapril, podrían ser de difícil acceso al ser vehículos de marcas comerciales [1, 10].

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos

Cromatógrafo Merck Hitachi modelo D-7000, con detector UV de arreglo de diodos, columna cromatográfica RP 18 de 150 × 4,6 mm y tamaño de partícula 5 μm, balanza analítica Mettler Toledo XP 205 serie 1126300620, baño de ultrasonido US-0061

Elma E 300H Elmasonic, termohigrómetro Digital Traceable VWR, baño maría Precisión Scientific modelo TS-66618 AZ-1.

Materiales

Tabletas de maleato de enalapril de 20 mg, estándar USP de maleato de enalapril, agua destilada, metanol calidad HPLC (Merck), fosfato de potasio (Merck), ácido clorhídrico (Merck), hidróxido de sodio grado reactivo (Merck), ácido ascórbico (Research Pharmaceutical S,A), ácido ortofosfórico (Merck), peróxido de hidrógeno (Merck) y dextrosa al 5% USP (Baxter).

Preparación de la suspensión extemporánea

En un mortero de porcelana con pistilo, se trituraron 20 tabletas de maleato de enalapril hasta obtener un polvo fino. De la mezcla se pesó el equivalente a 20 mg de maleato de enalapril (previa determinación de la variación de peso), la cual se llevó a un balón aforado de 200 mL y se adicionó 50 mL del vehículo seleccionado (vehículo 1: solución dextrosa 5% y agua 1:1 ó vehículo 2: solución dextrosa 5% y agua 1:1 pH ajustado a 3,0 con ácido ascórbico), se agitó vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Finalmente, se completó a volumen con el vehículo seleccionado, se agitó nuevamente y se envasó en frascos de plástico ámbar o transparentes con capacidad de 60 mL y tapa rosca plástica. Las preparaciones extemporáneas de maleato de enalapril fueron almacenadas a (5 ± 2) °C (nevera PHILIPS Polarix) y a (25 ± 2) °C (estufa de calentamiento IKA C-MA6-HS7).

Estandarización del método

Se desarrolló y validó la metodología para este producto teniendo como punto de partida las condiciones cromatográficas aplicadas para un estudio de estabilidad química de maleato de enalapril del Departamento de investigación de la Universidad de Concepción, Chile [11, 12]. Se modificó el método para la estandarización y optimización de las condiciones cromatográficas, con el fin de lograr parámetros cromatográficos que representaran la idoneidad del sistema para la cuantificación del principio activo en suspensión [13, 14].

Preparación de la muestra

La muestra fue obtenida mediante la trituración de 20 tabletas hasta obtener un polvo fino (de la mezcla se pesó el equivalente a 20 mg/tableta de maleato de enalapril). Una porción de 1450 mg del polvo se transfirió a un balón aforado de 200 mL, se adicionaron 50 mL del vehículo 1 y se agitó vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea, se completó volumen con el vehículo seleccionado y se agitó nuevamente. Igual procedimiento se siguió para el vehículo 2. Posteriormente, se transfirió una alícuota

de 5 mL a un balón aforado de 25 mL, se diluyó con agua, agitando vigorosamente y aforando a continuación con agua.

Selectividad

La selectividad se evaluó en relación a los excipientes y a los productos de la degradación forzada del activo. Para ello, se preparó una mezcla de los componentes de la formulación de la tableta de maleato de enalapril, pesando el doble de la cantidad en que se encuentran en la suspensión (excluyendo al principio activo) y se llevó el placebo a una concentración similar a la de las muestras durante el análisis de cuantificación del analito de interés. Tanto los excipientes que hacen parte de la matriz de las tabletas como el maleato de enalapril fueron sometidos a degradación forzada realizando pruebas de hidrólisis acuosa, ácida, básica, sometiendo las muestras a calentamiento en cada caso a una temperatura de 70 °C por 12 horas. Las degradaciones se llevaron a cabo con NaOH 0,1N, HCl 0,1N, peróxido de hidrógeno al 3% y exposición al medio ambiente por 12 horas diarias, día luz, durante cuarenta horas.

Linealidad

La linealidad del sistema y del método se determinó analizando la matriz de la suspensión enriquecida con el estándar de maleato de enalapril en concentraciones 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 y 0,30 mg/mL.

Precisión

La repetibilidad se evaluó mediante la preparación de una solución de muestra a la concentración nominal del 100% (aproximadamente 0,2 mg/mL de maleato de enalapril). La precisión intermedia se evaluó entre días y entre analistas, realizando determinaciones en dos días diferentes, por dos analistas y valorando tres réplicas por día.

Exactitud

Se determinó la exactitud de la metodología para tres niveles de concentración 0,1, 0,2 y 0,3 mg/mL, equivalentes al 50% 100% y 150% respectivamente y realizando tres réplicas para cada nivel.

Procesamiento de las muestras para análisis

La evaluación de la concentración remanente de activo de cada una de las muestras se valoró por duplicado utilizando el método por HPLC previamente validado. Para esto, antes de llevar las muestras de las preparaciones elaboradas al equipo HPLC fueron filtradas a través de membranas de 0,45 µm y posteriormente se pasaron por un filtro de jeringa hidrofílico de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0,22 µm. El volumen restante

de las muestras (antes de filtrar) se utilizó para evaluar la estabilidad física y microbiológica. El estudio se llevó a cabo según tiempos de análisis preestablecidos de 0, 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 y 360 horas, en dos lotes de una marca comercial de maleato de enalapril escogida al azar.

Evaluación de la estabilidad física

Las propiedades físicas de cada una de las muestras fueron evaluadas mediante la observación del color y olor, medición de pH en las diferentes condiciones del estudio y comparando con un blanco. El resultado fue reportado como cambio o no cambio y los valores de pH se determinaron en un pH-metro Mettler Toledo Seven Easy.

Evaluación de la estabilidad química

Para la evaluación de las propiedades químicas se realizó el análisis del porcentaje remanente de enalapril maleato encontrado en cada muestra almacenadas a $5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ en frasco ámbar o transparente, en función del tiempo para los dos lotes, cada uno con dos réplicas. Al iniciar el almacenamiento y al cabo de 12, 24, 36, 48, 72, 120, 168, 240 y 360 horas, las muestras fueron evaluadas. Se tuvo en cuenta que según lo exigido por la norma el porcentaje de enalapril debe encontrarse entre 90 y 110% [8]. La determinación del tiempo de vida útil se realizó para la mejor condición y se calculó mediante un análisis de varianza para la regresión, con el cual además se comparó la diferencia estadística entre los dos lotes.

Evaluación de la estabilidad microbiológica

Para el estudio microbiológico se realizó un recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, y ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para el recuento de aerobios mesófilos y de mohos y levaduras se realizaron las diluciones requeridas (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) teniendo en cuenta de no utilizar menos de 1 g de la muestra a ser examinada. Para aerobios mesófilos las diluciones fueron vertidas en Agar Tripticasa de Soya fundido y se incubaron por 3 días entre 30 y 35 °C y para mohos y levaduras en Agar Sabouraud y se incubaron las cajas de Petri por 3 días a 20 – 25 °C. Utilizando el contador de colonias, se realizó el recuento de las cajas y el cálculo estándar en placa. Para *S. aureus* se utilizó una caja con Agar Manitol-Salado y se incubó durante 72 horas a 30 – 35 °C; se observó la aparición de colonias típicas de *S. aureus* amarillas o blancas rodeadas por una zona amarilla, si pasado este tiempo no aparecían colonias se reportaba como ausencia de *S. aureus*. Para *Salmonella* se inoculó en placas de Agar XLD (Xilosa-Lisina –Desoxicolato) y se incubó a 30 – 35 °C durante 48 horas; la presencia de colonias bien desarrolladas de color rojo con o sin centro negro indicaba la posible presencia de *Salmonella*. Para *E. coli* se cultivó en placa de Agar MacConkey y se incubó a 30 – 35 °C, durante 72 horas; posteriormente se realizó la

observación de crecimiento o no crecimiento de *E. coli*. Para *Pseudomonas* se utilizó un Agar Cetrimide y nuevamente se incubó a 30 – 35 °C durante 18 – 72 horas; posteriormente se realizó la observación de crecimiento o no crecimiento. Las muestras cumplen con las especificaciones si no hay presencia de colonias o si las pruebas confirmatorias son negativas. El estudio microbiológico de las preparaciones extemporáneas se realizó durante 10 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistema de idoneidad

La idoneidad del sistema cromatográfico se verificó empleando el estándar de maleato de enalapril USP a una concentración de 0,1 mg/mL con un coeficiente de variación para las áreas de 0,297%, tomando como referencia un valor de no más de 2,0% en inyecciones repetidas [8].

El factor de capacidad fue 1,46, el número de platos teóricos fue 5471 (CV 0,66%) y el factor de asimetría 1,16 (CV 1,97%). El análisis cromatográfico indica que los resultados obtenidos del coeficiente de variación para los parámetros de tiempo de retención, áreas, factor de capacidad, platos teóricos y asimetría cumplen con lo establecido por la farmacopea USP 38 [8]. Por tal razón, el sistema cromatográfico es confiable y se puede utilizar para la validación de la metodología propuesta y el análisis del producto.

Estandarización del sistema cromatográfico

Después de realizar modificaciones en las condiciones cromatográficas y siguiendo las condiciones planteadas por el Departamento de investigación de la Universidad de Concepción [12], se determinó que las condiciones cromatográficas empleadas en el estudio fueran las siguientes: columna RP 18 de 150 × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μm, temperatura de la columna 23 ± 2 °C, fase móvil 55% metanol 45% buffer fosfato 0,01 M ajustado con ácido fosfórico a pH 2,2, flujo de la fase móvil: 1 mL/min, volumen de inyección: 20 μL y longitud de onda de detección: 215 nm.

Contenido teórico de la preparación de la muestra. Al seguir el procedimiento de preparación de la muestra empleando como vehículo la mezcla dextrosa al 5% y agua en proporción 1:1, al igual que el vehículo 2, la concentración esperada de maleato de enalapril obtenida fue de 0,2 mg/mL.

Selectividad

El análisis cromatográfico de las muestras evaluadas permite evidenciar que ni los excipientes de la matriz ni los productos de degradación interfieren con las señales corres-

pondientes al enalapril maleato (Figura 1). Lo anterior permite concluir que el método es selectivo y facilita la cuantificación del principio activo. En los cromatogramas de la degradación del enalapril maleato sufrida en las condiciones de estrés se identifica que el pico correspondiente al enalapril maleato tiene un tiempo de retención de 3,0-3,28 y los otros picos en tiempos de retención diferentes. Bajo condiciones de hidrólisis y oxidación el enalapril se degrada en varios compuestos como la dicetopiperazina con un tiempo de retención de 5,40-5,61 y el ácido málico con un tiempo de retención aproximado de 1,0, los otros picos muy posiblemente se deban a impurezas que no han sido identificadas que aparecen con un tiempo de retención de 1,59 y 1,60 y la señal 4,2 posiblemente corresponda a la Vitamina C [15].

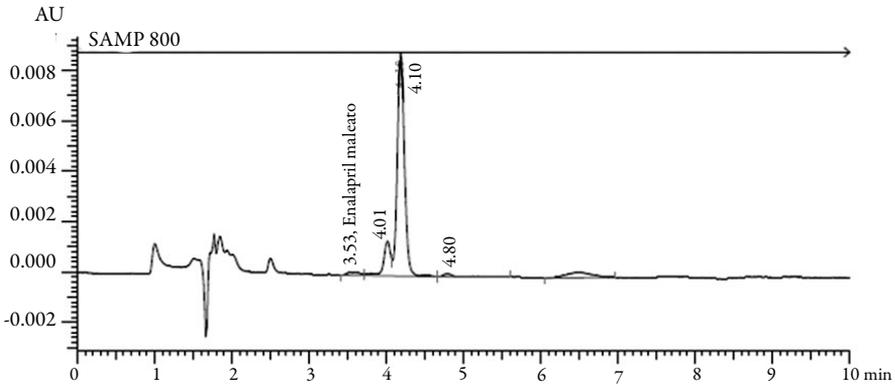


Figura 1. Selectividad frente a los excipientes.

Linealidad

Dentro de los rangos de concentración estudiados, tanto para el sistema como para el método, se obtuvo un comportamiento lineal, con un coeficiente de determinación de 0,999. Mediante la prueba *t* se determinó que los interceptos no son estadísticamente diferentes de cero y que las pendientes son estadísticamente diferentes de cero. Los resultados del análisis de varianza para la linealidad del sistema y del método, mediante las pruebas *F* y ANOVA, nos podrían indicar que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones, asimismo los *F* calculados tanto para el sistema como para el método son menores al valor del *F* de la tabla, corroborando el cumplimiento de la linealidad de la metodología (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de validación de la metodología analítica

| Parámetro | Prueba estadística | Estadístico experimental | Estadístico tabulado | Concepto |
|------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|---|
| Linealidad del sistema | Prueba F de Fisher | 28512,406 | 4,670 | $F_{exp} > F_{tab}$ La regresión es significativa |
| Linealidad del método | Prueba F de Fisher | 23936,058 | 4,960 | $F_{exp} > F_{tab}$ La regresión es significativa |
| Precisión intermedia | Prueba F de Fisher | 1,336 | 4,387 | $F_{exp} < F_{tab}$ No existe diferencia significativa entre los resultados |
| Exactitud | Prueba t de Student | 2,439 | 2,306 | $t_{exp} > t_{tab}$ Hay diferencia significativa entre los datos |
| | Prueba de Cochran | 0,521 | 0,870 | $G_{exp} < G_{tab}$ La concentración no afecta la variabilidad de los resultados |

Precisión

Los coeficientes de variación obtenidos para la precisión del sistema y del método fueron 0,50% y 1,11% respectivamente, los cuales son inferiores al valor máximo aceptado para métodos cromatográficos (2%), indicando una adecuada repetibilidad para el sistema como para el método. Para la precisión intermedia del método el coeficiente de variación de las respuestas fue de 1,09%. El análisis de varianza, mediante un test F , indica que no existe diferencia significativa en los resultados por cambio de analistas o al realizar el análisis en diferentes días (Tabla 1).

Exactitud

Los porcentajes de recuperación obtenida se encontraron en un intervalo entre 100,08 y 101,92%, cumpliendo con el criterio de aceptación, donde el promedio total de los porcentajes recuperados debe estar entre el rango de 98 y 102 %, En la prueba t de Student, el valor $t_{exp} > t_{tab}$, conduce a fallar en el rechazo de la hipótesis nula H_0 y por tanto, se concluye que la probabilidad de obtener un valor t , con ocho grados de libertad, igual o mayor a 2,4398 es aproximadamente 0,005, cuando el promedio es 100,877; es decir, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos y el 100%. La prueba de Cochran indica que el nivel de concentración no afecta la variabilidad de los resultados, al ser $G_{exp} < G_{tab}$ (Tabla 1).

Propiedades físicas (estabilidad física) de las formulaciones

En todas las muestras de estudio no se observaron cambios de color ni olor de la suspensión, permaneciendo con el color y olor característicos de la muestra inicial. Asi-

mismo, la variación de pH en las diferentes condiciones de estudio no es significativa, lo que indica que químicamente es estable frente a esta condición. Sin embargo, al comparar el remanente de activo en los dos vehículos empleados, se evidencia que en el vehículo 2 el porcentaje de remanente de activo sale de los límites en un menor tiempo a comparación del vehículo 1.

Tabla 2. Datos de estabilidad utilizando el vehículo 1 (dextrosa 5% - agua 1:1).

| Tiempo de muestreo (Horas) | t (°C) | N° muestra (vial (1) Ámbar y (2) Transparente) | Lote 1 | | Lote 2 | |
|----------------------------|---------|--|-------------|------|-------------|------|
| | | | % Remanente | pH | % Remanente | pH |
| 0 | 5±2 °C | 1 | 100,662 | 6,42 | 103,450 | 6,39 |
| | | | 100,950 | | 102,965 | |
| | | 2 | 100,662 | 6,42 | 103,450 | 6,39 |
| | | | 100,950 | | 102,965 | |
| | 25±2 °C | 1 | 100,662 | 6,42 | 103,450 | 6,39 |
| | | | 100,950 | | 102,965 | |
| | | 2 | 100,662 | 6,42 | 103,450 | 6,39 |
| | | | 100,950 | | 102,965 | |
| 12 | 5±2 °C | 1 | 101,072 | 6,41 | 100,983 | 6,41 |
| | | | 100,634 | | 101,818 | |
| | | 2 | 99,396 | 6,40 | 99,790 | 6,39 |
| | | | 98,402 | | 101,824 | |
| | 25±2 °C | 1 | 99,687 | 6,40 | 99,518 | 6,40 |
| | | | 100,982 | | 98,819 | |
| | | 2 | 100,100 | 6,41 | 98,669 | 6,39 |
| | | | 100,546 | | 98,861 | |
| 24 | 5±2 °C | 1 | 99,055 | 6,39 | 101,235 | 6,40 |
| | | | 98,674 | | 101,235 | |
| | | 2 | 98,097 | 6,42 | 99,753 | 6,40 |
| | | | 99,975 | | 100,800 | |
| | 25±2 °C | 1 | 100,096 | 6,38 | 99,593 | 6,39 |
| | | | 99,994 | | 99,083 | |
| | | 2 | 97,780 | 6,41 | 100,924 | 6,41 |
| | | | 99,028 | | 100,691 | |
| 36 | 5±2 °C | 1 | 100,595 | 6,38 | 101,393 | 6,40 |
| | | | 100,224 | | 100,299 | |
| | | 2 | 100,290 | 6,37 | 101,055 | 6,43 |
| | | | 99,545 | | 99,313 | |
| | 25±2 °C | 1 | 99,485 | 6,41 | 101,154 | 6,40 |
| | | | 99,531 | | 102,059 | |
| | | 2 | 100,317 | 6,42 | 100,365 | 6,37 |
| | | | 99,219 | | 101,250 | |

(Continúa)

| Tiempo de muestreo (Horas) | t (°C) | N° muestra (vial (1) Ámbar y (2) Transparente) | Lote 1 | | Lote 2 | |
|----------------------------|---------|--|-------------|---------|-------------|------|
| | | | % Remanente | pH | % Remanente | pH |
| 48 | 5±2 °C | 1 | 100,131 | 6,40 | 99,237 | 6,41 |
| | | | 97,383 | | 99,675 | |
| | | 2 | 99,422 | 6,34 | 98,307 | 6,36 |
| | | | 100,013 | | 98,307 | |
| | 25±2 °C | 1 | 99,954 | 6,39 | 101,630 | 6,38 |
| | | | 99,365 | | 98,730 | |
| 2 | | 99,458 | 6,40 | 99,176 | 6,40 | |
| | | 98,198 | | 99,176 | | |
| 72 | 5±2 °C | 1 | 101,759 | 6,38 | 100,096 | 6,42 |
| | | | 100,797 | | 100,995 | |
| | | 2 | 100,529 | 6,36 | 100,040 | 6,36 |
| | | | 99,608 | | 99,892 | |
| | 25±2 °C | 1 | 100,686 | 6,34 | 100,714 | 6,34 |
| | | | 100,686 | | 100,115 | |
| 2 | | 100,430 | 6,37 | 100,183 | 6,41 | |
| | | 100,430 | | 100,020 | | |
| 120 | 5±2 °C | 1 | 97,765 | 6,37 | 98,854 | 6,42 |
| | | | 97,865 | | 98,676 | |
| | | 2 | 99,862 | 6,40 | 99,625 | 6,38 |
| | | | 99,210 | | 99,634 | |
| | 25±2 °C | 1 | 97,765 | 6,37 | 99,114 | 6,34 |
| | | | 97,865 | | 98,372 | |
| 2 | | 98,346 | 6,35 | 98,356 | 6,36 | |
| | | 97,429 | | 98,820 | | |
| 168 | 5±2 °C | 1 | 96,441 | 6,39 | 95,763 | 6,38 |
| | | | 97,052 | | 96,591 | |
| | | 2 | 96,451 | 6,32 | 97,097 | 6,37 |
| | | | 97,896 | | 97,149 | |
| | 25±2 °C | 1 | 96,019 | 6,40 | 95,062 | 6,37 |
| | | | 96,032 | | 96,654 | |
| 2 | | 94,764 | 6,38 | 95,143 | 6,39 | |
| | | 94,408 | | 95,120 | | |
| 240 | 5±2 °C | 1 | 90,197 | 6,36 | 91,038 | 6,32 |
| | | | 90,774 | | 90,517 | |
| | | 2 | 90,881 | 6,38 | 90,057 | 6,36 |
| | | | 91,116 | | 89,556 | |
| | 25±2 °C | 1 | 90,197 | 6,32 | 88,366 | 6,35 |
| | | | 90,774 | | 88,940 | |
| 2 | | 90,008 | 6,34 | 89,092 | 6,38 | |
| | | 90,729 | | 89,146 | | |

(Continúa)

| Tiempo de muestreo (Horas) | t (°C) | N° muestra (vial (1) Ámbar y (2) Transparente) | Lote 1 | | Lote 2 | |
|----------------------------|---------|--|-------------|------|-------------|------|
| | | | % Remanente | pH | % Remanente | pH |
| 360 | 5±2 °C | 1 | 90,604 | 6,28 | 89,335 | 6,28 |
| | | | 89,760 | | 90,035 | |
| | | 2 | 89,395 | 6,30 | 89,049 | 6,34 |
| | | | 90,379 | | 90,155 | |
| | 25±2 °C | 1 | 89,177 | 6,30 | 89,477 | 6,27 |
| | | | 89,285 | | 88,215 | |
| | | 2 | 89,686 | 6,28 | 90,008 | 6,25 |
| | | | 90,246 | | 90,078 | |

Tabla 3. Datos de estabilidad utilizando el vehículo 2 (dextrosa 5% - agua 1:1, pH 3,0),

| Tiempo de muestreo (Horas) | t (°C) | N° muestra (vial (1) Ambar y (2) Transparente) | Lote 1 | | Lote 2 | |
|----------------------------|---------|--|-------------|------|-------------|------|
| | | | % Remanente | pH | % Remanente | pH |
| 0 | 5±2 °C | 1 | 101,740 | 3,05 | 101,111 | 3,02 |
| | | | 101,510 | | 102,796 | |
| | | 2 | 101,740 | 3,05 | 101,111 | 3,02 |
| | | | 101,510 | | 102,796 | |
| | 25±2 °C | 1 | 101,740 | 3,05 | 101,111 | 3,02 |
| | | | 101,510 | | 102,796 | |
| | | 2 | 101,740 | 3,05 | 101,111 | 3,02 |
| | | | 101,510 | | 102,796 | |
| 12 | 5±2 °C | 1 | 98,737 | 3,05 | 100,961 | 3,04 |
| | | | 98,982 | | 100,120 | |
| | | 2 | 97,928 | 3,03 | 99,616 | 3,02 |
| | | | 98,144 | | 99,427 | |
| | 25±2 °C | 1 | 97,949 | 3,05 | 98,345 | 3,02 |
| | | | 99,484 | | 99,329 | |
| | | 2 | 98,380 | 3,04 | 98,276 | 3,02 |
| | | | 98,695 | | 100,647 | |
| 24 | 5±2 °C | 1 | 92,947 | 3,02 | 98,567 | 3,01 |
| | | | 93,304 | | 97,586 | |
| | | 2 | 92,247 | 3,04 | 96,542 | 3,00 |
| | | | 91,993 | | 97,344 | |
| | 25±2 °C | 1 | 91,629 | 3,01 | 97,216 | 3,02 |
| | | | 91,125 | | 95,133 | |
| | | 2 | 97,073 | 3,05 | 96,400 | 2,99 |
| | | | 96,205 | | 95,097 | |

(Continúa)

| Tiempo de muestreo (Horas) | t (°C) | N° muestra (vial (1) Ambar y (2) Transparente) | Lote 1 | | Lote 2 | |
|----------------------------|---------|--|-------------|------|-------------|------|
| | | | % Remanente | pH | % Remanente | pH |
| 36 | 5±2 °C | 1 | 88,562 | 3,05 | 94,594 | 3,03 |
| | | | 86,986 | | 94,594 | |
| | | 2 | 91,064 | 3,04 | 94,599 | 3,02 |
| | | | 89,167 | | 93,231 | |
| | 25±2 °C | 1 | 92,548 | 3,02 | 94,935 | 3,01 |
| | | | 89,647 | | 94,935 | |
| | | 2 | 92,730 | 3,04 | 96,229 | 3,02 |
| | | | 91,714 | | 94,318 | |

Estabilidad química de las formulaciones

Respecto a la variación de la concentración de enalapril maleato se observa que la suspensión envasada en frasco ámbar o transparente estudiadas a 5±2 °C o 25±2 °C y utilizando el vehículo 1 (tabla 2) en las primeras 240 horas, no presentó variación de la concentración del activo; los valores de la cantidad remanente se encuentran dentro del porcentaje del 90 al 110% exigido por la norma, lo que indica que químicamente hasta este tiempo es estable. A partir de las 240 horas se presenta una disminución del porcentaje, alcanzando el 89,335%. Estadísticamente su diferencia no es significativa, pero no cumpliría la norma del porcentaje de la cantidad remanente, indicando que se empieza a mostrar una posible influencia de la condición de exposición o del vehículo de la preparación. Respecto al pH de la suspensión utilizando el vehículo 1 se observa que su variación no es significativa durante el tiempo ni en las condiciones del estudio; encontrándose un valor promedio de pH de 6,37 para las preparaciones.

La preparación con el vehículo 2 ajustado a pH 3,0 tienen un tiempo máximo de estabilidad de 24 horas envasada en frasco ámbar o transparente y estudiada a 5±2 °C o 25±2 °C y la cantidad del activo se encuentra dentro de los límites permitidos. A partir de este tiempo disminuye la cantidad remanente del enalapril maleato y posiblemente se debe al pH que acelera los procesos degradativos, estando de acuerdo con lo reportado en la literatura [12], que en medio ácido y específicamente en pH de 4,6 a 4,8 la preparación es más estable. Pero a valores de pH menores a 4 se acelera la degradación con la formación del enalapril dicetopiperazina con un porcentaje cercano al 17 %

Estabilidad microbiológica de las formulaciones

Durante los diez días (240 horas) del estudio microbiológico de las muestras (tabla 4), se evidenció que las preparaciones extemporáneas cumplen con las especificaciones de recuento microbiológico, lo cual indica las buenas condiciones de limpieza e higiene en la elaboración y envase y que deben ser consideradas en el protocolo de elaboración.

Tabla 4. Resultados estudio microbiológico

| Prueba | Especificaciones | Resultados |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| Recuento de aerobios mesófilos | Máx, 1000 UFC/g | Menor a 10 UFC/g |
| Recuento de mohos y levaduras | Máx, 1000 UFC/g | Menor a 10 UFC/g |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Ausentes | Cumple |
| <i>Salmonella</i> | Ausentes | Cumple |
| <i>Escherichia coli</i> | Ausentes | Cumple |
| <i>Pseudomonas</i> | Ausentes | Cumple |

Determinación del tiempo de vida útil de la preparación extemporánea

Teniendo en cuenta que la preparación extemporánea presenta una mayor estabilidad en el vehículo 1 (dextrosa al 5% - agua 1:1), bajo la condición de temperatura de 5 ± 2 °C y almacenada en frasco transparente, se utilizaron los datos de porcentaje remanente de activo de esta condición (tabla 2) para determinar el tiempo de vida útil de la preparación extemporánea. Se realizó el análisis de regresión lineal para los lotes uno y dos. El tratamiento estadístico realizado indica que no existen diferencias significativas entre los lotes 1 y 2 (tabla 5), ya que los valores de los F calculados son menores que los F de la tabla, por lo cual se acepta la hipótesis nula. Los resultados obtenidos permiten combinar los datos de ambos lotes para estimar la degradación de la preparación extemporánea en la condición de estudio establecido para la muestra.

Tabla 5. Resumen tratamiento estadístico determinación del tiempo de vida útil vehículo dextrosa 5% - agua 1:1, frasco transparente, 5 ± 2 °C.

| Comparación entre lotes | SCR | | Ho: L1=L2 Se acepta Ho | |
|-------------------------|-------------|-----|---------------------------|---------------------------|
| Lote 1 | 46,78688541 | | | |
| Lote 2 | 70,25090841 | | | |
| Lote 1+2 | 120,1328406 | | | |
| Comparación | gln | gld | F calculado | F tabla ($\alpha=0,05$) |
| Modelos | 2 | 36 | 0,476007288 | 3,232 |
| Pendientes | 1 | 36 | 0,952014575 | 4,085 |
| Interceptos | 1 | 37 | 0,978459424 | 4,085 |

gln: grados de libertad del numerador, gld: grados de libertad del denominador

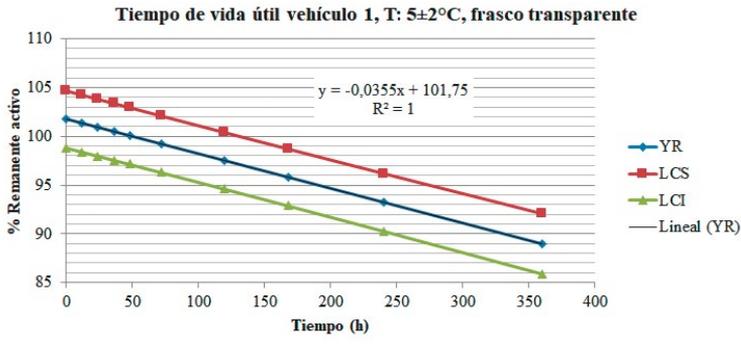


Figura 2. Tiempo de vida útil vehículo dextrosa 5% - agua 1:1, frasco transparente, 5±2°C.

En la gráfica para la determinación de la vida útil de la preparación extemporánea (Figura 2) se observa una pendiente negativa, lo que indica la degradación del activo en función del tiempo bajo la condición de estudio. Tomando como límite de confianza el 90% de la concentración de activo (remanente) se logra determinar que en un tiempo menor a 250 horas la preparación extemporánea cumple lo establecido por la norma respecto a la cantidad de activo, lo cual garantiza una respuesta terapéutica por parte del enalapril maleato.

CONCLUSIONES

Los resultados de la validación de la metodología por HPLC muestran que es selectiva, lineal, precisa y exacta, por lo tanto es confiable para ser utilizada en la cuantificación del activo enalapril maleato presente en esta preparación extemporánea.

El estudio de estabilidad realizado indica que la preparación extemporánea de enalapril maleato elaborada con el vehículo 1 (dextrosa al 5% - agua en mezcla 1:1) es químicamente más estable durante un tiempo de 240 horas, almacenada a una temperatura de 5±2 °C y 25±2 °C en frasco transparente o ámbar. Además, no se observaron cambios significativos de pH, olor y color que puedan afectar la estabilidad de la suspensión en el tiempo de estudio. La preparación elaborada con el vehículo 2 (dextrosa al 5% - agua 1:1 y ajustada a pH 3,0) es más susceptible a la degradación, lo que indica que no es recomendable utilizar este vehículo en la elaboración de la preparación extemporánea.

Como resultado de la investigación se estableció el protocolo para la preparación extemporánea que garantiza su estabilidad durante 10 días siempre y cuando se almacene a una temperatura de 5±2 °C. Este corresponde a tomar 5 tabletas de enalapril

maleato con un contenido de 10 mg por tableta, triturar hasta polvo fino y adicionar 25 mL de solución de dextrosa al 5% y 25 mL de agua destilada, obteniendo una suspensión en concentración del activo de 1 mg/mL, envasar en frasco ámbar de 60 mL con tapa rosca, etiquetar correctamente y dosificar según recomendación médica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional de Colombia, la Universidad del Atlántico y al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Laboratorios Procaps Barranquilla, por facilitar los equipos y las instalaciones necesarias para el desarrollo de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

1. K. Sosnowska, K. Winnicka, A. Czajkowska-Kośnik, Stability of extemporaneous enalapril maleate suspensions for pediatric use prepared from commercially available tablets, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **66**(3), 321–326 (2009). URL: https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2009/3/321.pdf
2. D.J. Woods, Extemporaneous formulations - Problems and solutions, *Paediatric and Perinatal Drug Therapy*, **1**, 25-29 (1997).
3. E.H. Nieto-Mejía, *Estudio de estabilidad física y química de una preparación extemporánea de sildenafil citrato para uso pediátrico*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2014. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/51507/192575.11-2014.pdf?sequence=1>
4. J.E. Ariza-Paba, *Estudios de estabilidad física y química de una preparación extemporánea de enalapril maleato para uso hospitalario*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2013. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/60077/8713686.2013.pdf?sequence=1>
5. S.P. Denyer, N. Hodges, S.P. Gorman, B. Gilmore (editors), *Hugo & Russell's Pharmaceutical Microbiology*, 8th ed., Wiley-Blackwell, Hoboken (NJ), 2011.

6. E.Y. Machado-Mercado, *Estudio de estabilidad física y química de una preparación líquida extemporánea elaborada a partir de clindamicina cápsulas*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2014. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/74934/emilseyolimamachadomercado.2014.pdf>
7. K.L. Maldonado-Julio, *Estudio de estabilidad física y química de una preparación extemporánea elaborada a partir de tabletas de espirolactona, para uso pediátrico*, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., 2014. URL: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51331>
8. USP38-NF33, Tomo 1, *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, Rockville (MD), 2015.
9. K. Momma, ACE Inhibitors in Pediatric Patients with Heart Failure, *Pediatric Drugs*, **8**(1), 55-69 (2006). Doi: <https://doi.org/10.2165/00148581-200608010-00005>
10. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), Sistema de trámites en línea consultas públicas, Bogotá D. C., 2017. URL: https://consultaregistro.invima.gov.co/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp
11. USP 35-NF 30, *Farmacopea de los Estados Unidos de América*, Rockville (MD), 2012.
12. M.d. Diego, G. Godoy, S. Mennickent, R. Godoy, Chemical stability of enalapril maleate drug substance and tablets by a stability-indicating liquid chromatographic method, *Química Nova*, **34**(3), 450-454 (2011). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000300016>
13. T. Marquez-Conde, I. Corrales-Álvarez, M. Gil-Apan, L. Martínez-Álvarez, Obtención de enalapril dicetopiperacino como sustancia de referencia, *Latin American Journal of Pharmacy*, **26**(1), 130-133 (2007). URL: http://www.lata-mjpharm.org/trabajos/26/1/LAJOP_26_1_3_6_TIIYELY8X5.pdf
14. B. Stanisz, Kinetics of degradation of enalapril maleate in dosage forms, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, **61**(6), 415-418 (2004). URL: https://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2004/6/415.pdf
15. S. Bhardwaj, P.S. Sing, Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**(1), 113-120 (2008). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.09.014>

COMO CITAR ESTE ARTÍCULO

J.E. Ariza-Paba, B.M. Vallejo-Díaz, C.E. Plazas-Bonilla, H.d.J. Barbosa-Barbosa, Estudio de la estabilidad física, química y microbiológica de una preparación extemporánea a base de maleato de enalapril, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **53**(1), 164-183 (2024). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v53n1.112980>