



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Desarrollo de un liofilizado oral antihistamínico de segunda generación

Paloma Flórez Borges

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACEUTICA

Programa de doctorado en Investigación, Desarrollo y Control de Medicamentos

**DESARROLLO DE UN LIOFILIZADO ORAL ANTIHISTAMÍNICO DE  
SEGUNDA GENERACIÓN**

Memoria presentada por Paloma Flórez Borges para optar al título de Doctor por la  
Universidad de Barcelona

Paloma Flórez Borges, 2016



FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACEUTICA

Programa de doctorado en Investigación, Desarrollo y Control de Medicamentos

**DESARROLLO DE UN LIOFILIZADO ORAL ANTIHISTAMÍNICO  
DE SEGUNDA GENERACIÓN**

Memoria presentada por Paloma Flórez Borges para optar al título de Doctor por la  
Universidad de Barcelona

Prof. Dr. Josep Ma Suñe i Negre

Dr. Enric Jo Cardoso

Director

Director

Paloma Flórez Borges

Doctoranda

Paloma Flórez Borges, 2016



## **LISTADO DE PUBLICACIONES**

Esta tesis doctoral contiene un artículo científico de investigación publicado con las siguientes características (Anexo I):

Título: “DETERMINATION OF STRESS-INDUCED DEGRADATION PRODUCTS OF CETIRIZINE DIHYDROCHLORIDE BY A STABILITY-INDICATING RP-HPLC METHOD”.

Autores: Flórez Borges P, Pérez Lozano P, García Montoya E, Miñarro M, Ticó JR, Jo E and Suñe Negre JM.

Revista: DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2014, 22:82.

Índice de impacto: 1,64

**Número DOI:** 10.1186/s40199-014-0082-5

**Fecha de publicación:** 09 de diciembre de 2014.

Acceso en PUBMED:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25487685?dopt=Abstract&holding=f1000,f1000m,isrctn>

También contiene una publicación en formato e-poster para el congreso internacional European Pharma Congress (August 25-27, 2015 Valencia, Spain) de OMICS International (Anexo II):

PRELIMINARY STUDIES OF FORMULATION DEVELOPMENT OF AN ORAL LYOPHILISATE

Flórez Borges P, Pérez Lozano P, García Montoya E, Miñarro M, Ticó JR, Jo E, Suñe Negre JM.

<http://europe.pharmaceuticalconferences.com/2015/eposter-presentation.php>



## ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
CTZ	Cetirizina dihidrocloruro
CV%	Coefficiente de variación
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
SD	Desviación estándar
DRX	Difracción por Rayos X
Ph. Eur	Farmacopea Europea
ICH	International Conference of Harmonization
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
LO	Liofilizado oral
$\lambda$	Longitud de onda
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
FDM	Microscopía de Liofilización
PVP	Polivinilpirrolidona
PVC	Polivinil cloruro
PVDC	Polivinil dicloruro
PT	Punto triple
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SNC	Sistema Nervioso Central
Te	Temperatura eutéctica
Tc	Temperatura de colapso
Tg'	Temperatura de transición vítrea
t <sub>max</sub>	Tiempo máximo
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
t <sub>1/2</sub>	Tiempo de semivida



# **ÍNDICE**



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>5</b>
<b>PARTE BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
<b>1. LIOFILIZACIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. DIAGRAMA DE FASES DEL AGUA</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2. CONGELACIÓN</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. La formación del hielo .....	12
1.2.2. El concepto de agua libre y agua ligada .....	13
<b>1.3. SECADO PRIMARIO</b> .....	<b>13</b>
1.3.1. Fases del secado primario .....	13
1.3.2. Temperatura eutéctica .....	14
1.3.3. Temperatura de transición vítrea.....	14
<b>1.4. SECADO SECUNDARIO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.5. FUNCIONAMIENTO DE UN EQUIPO DE LIOFILIZACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>2. EL LIOFILIZADO ORAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. CONCEPTO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2. CARACTERÍSTICAS</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3. PATENTES DE FABRICACIÓN DE LIOFILIZADOS ORALES</b> .....	<b>18</b>
2.3.1. Zydis®.....	18
2.3.1.1. <i>Fabricación según técnica Zydis®</i> .....	19

2.3.2.	Quicksolv® .....	19
2.3.3.	Lyoc ®.....	19
<b>2.4.</b>	<b>LOS EXCIPIENTES DE UN PRODUCTO LIOFILIZADO.....</b>	<b>20</b>
2.4.1.	El estado físico de los solutos .....	20
2.4.2.	Aplicación de los excipientes para formulaciones liofilizadas .....	21
2.4.2.1.	<i>Agentes de carga</i> .....	23
2.4.2.2.	<i>Crioprotectores</i> .....	23
2.4.2.3.	<i>Reacciones de Maillard</i> .....	24
<b>2.5.</b>	<b>LA MATRIZ DEL LIOFILIZADO ORAL .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.</b>	<b>AGENTES DE CARGA PROPUESTOS PARA LA FORMULACIÓN .....</b>	<b>25</b>
2.6.1.	Manitol .....	25
2.6.2.	PVP.....	30
<b>3.</b>	<b>CETIRIZINA DIHIDROCLORURO .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.</b>	<b>ESTRUCTURA MOLECULAR Y GRUPOS REACTIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y ORGANOLÉPTICAS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.</b>	<b>FARMACOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
3.3.1.	Mecanismo de acción .....	34
3.3.2.	Indicaciones terapéuticas.....	34
3.3.3.	Metabolismo e interacciones farmacológicas .....	35
3.3.3.1.	<i>Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)</i> .....	35
3.3.3.2.	<i>Fármacos que afectan a enzimas microsomales hepáticas</i> .....	35
3.3.3.3.	<i>Depresores del Sistema Nervioso Central</i> .....	35
<b>3.4.</b>	<b>POSOLOGÍA Y MODO DE ADMINISTRACIÓN .....</b>	<b>35</b>

<b>3.5. CONTRAINDICACIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6. EFECTOS SECUNDARIOS Y PRECAUCIONES .....</b>	<b>36</b>
3.6.1. Efectos hepáticos.....	37
3.6.2. Efectos en el SNC .....	37
3.6.3. Efectos en el sistema respiratorio.....	38
3.6.4. Efectos en tracto gastrointestinal.....	38
3.6.5. Efecto cardiovascular .....	38
3.6.6. Efectos dermatológicos y de sensibilidad .....	38
3.6.7. Efectos oculares y óticos .....	39
3.6.8. Porfiria.....	39
3.6.9. Efectos renales y genitourinarios .....	39
<b>3.7. POBLACIÓN GERIÁTRICA .....</b>	<b>39</b>
<b>3.8. MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD .....</b>	<b>39</b>
<b>3.9. EMBARAZO, FERTILIDAD Y LACTANCIA .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10. TOXICIDAD AGUDA .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11. FARMACOCINÉTICA.....</b>	<b>41</b>
3.11.1. Absorción .....	41
3.11.2. Distribución .....	42
3.11.3. Eliminación.....	43
<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>

<b>4.1. CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO .....</b>	<b>49</b>
4.1.1. Metodología .....	49
4.1.1.1. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i> .....	49
4.1.1.2. <i>Espectroscopía de Infrarrojo</i> .....	49
4.1.1.3. <i>Difracción por Rayos X</i> .....	49
4.1.1.4. <i>Espectrofotometría UV-Vis</i> .....	50
4.1.1.5. <i>Estudio de solubilidad a pH 1,2; 4,5; 6,8; 7,0</i> .....	50
4.1.1.6. <i>Diagrama SeDeM</i> .....	51
<b>4.2. MÉTODO ANALÍTICO .....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Reactivos .....	56
4.2.2. Equipos y condiciones cromatográficas .....	56
4.2.3. Estudios de degradación y preparación de las muestras .....	57
4.2.4. Validación del método analítico.....	58
<b>4.3. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN Y FORMULACIÓN .....</b>	<b>59</b>
4.3.1. Materiales .....	59
4.3.2. Equipos.....	59
4.3.3. Ciclo de liofilización .....	59
<b>4.4. TÉCNICAS PARA DISEÑO FACTORIAL 3<sup>2</sup> .....</b>	<b>60</b>
4.4.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	60
4.4.2. Microscopía de liofilización (FDM, Freeze drying microscopy).....	61
<b>4.5. CARACTERIZACIÓN DEL LIOFILIZADO ORAL .....</b>	<b>62</b>
4.5.1. Viscosidad de las soluciones E1, E2 y E3.....	62
4.5.2. Controles en proceso: pH y densidad.....	62
4.5.3. Fracturabilidad del liofilizado oral.....	62

4.5.4.	Tiempo de disgregación del liofilizado oral.....	63
4.5.5.	Ensayo de humedad residual mediante técnica Karl Fischer volumétrica ...	63
4.5.6.	Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	63
<b>4.6.</b>	<b>ESTUDIO DE ESTABILIDAD: ANÁLISIS DVS-TGA.....</b>	<b>63</b>
	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>5.1.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO .....</b>	<b>67</b>
5.1.1.	Resonancia Magnética Nuclear .....	67
5.1.2.	Espectroscopía de Infrarrojo .....	68
5.1.3.	Difracción de Rayos X .....	69
5.1.4.	Espectrofotometría UV-Vis.....	71
5.1.5.	Estudio de solubilidad para pH 1,2; 4,5; 6, 8 y 7,0.....	71
5.1.6.	Diagrama SeDeM.....	72
<b>5.2.</b>	<b>MÉTODO ANALÍTICO .....</b>	<b>74</b>
5.2.1.	Desarrollo del método analítico .....	75
5.2.2.	Ensayo de degradación.....	76
5.2.3.	Validación del método .....	83
5.2.3.1.	<i>Linealidad del ensayo para principio activo.....</i>	<i>83</i>
5.2.3.2.	<i>Precisión para ensayo del principio activo.....</i>	<i>88</i>
5.2.3.3.	<i>Exactitud para ensayo del principio activo.....</i>	<i>90</i>
5.2.3.4.	<i>Determinación de los límites de cuantificación y detección.....</i>	<i>90</i>
5.2.3.5.	<i>Linealidad, precisión y exactitud del método para 0,25 – 5 µg/ml.....</i>	<i>93</i>
<b>5.3.</b>	<b>PREFORMULACIÓN Y FORMULACIÓN DEL LIOFILIZADO ORAL</b>	<b>97</b>

5.3.1.	Ciclo de liofilización .....	97
5.3.2.	Pruebas de viabilidad de liofilización en vial y en moldes de PVC.....	97
5.3.2.1.	<i>Manitol y principio activo en vial</i> .....	97
5.3.2.2.	<i>PVP K30 y principio activo en vial y en molde de PVC</i> .....	98
5.3.2.3.	<i>Principio activo, manitol y PVP K30 en vial</i> .....	99
5.3.2.4.	<i>Principio activo, PVP K30 y manitol en molde PVC</i> .....	100
<b>5.4.</b>	<b>DISEÑO FACTORIAL 3<sup>2</sup>: SOLUCIONES A, B, C, D, E, F, G, H, I.....</b>	<b>104</b>
5.4.1.	Perfil calorimétrico diferencial de los excipientes y del principio activo ..	105
5.4.2.	Perfil calorimétrico diferencial de las soluciones del diseño factorial 3 <sup>2</sup> ..	109
5.4.3.	Microscopía de Liofilización (Freeze drying Microscopy, FDM) .....	114
5.4.4.	Estudio de viabilidad de liofilización con soluciones A, D y E.....	119
<b>5.5.</b>	<b>LIOFILIZADOS ORALES E1, E2 Y E3 .....</b>	<b>120</b>
<b>5.6.</b>	<b>ENMASCARAMIENTO DEL SABOR AMARGO .....</b>	<b>122</b>
<b>5.7.</b>	<b>VERIFICACIÓN DEL pH COMO CONTROL EN PROCESO DE FABRICACIÓN .....</b>	<b>123</b>
<b>5.8.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN E1, E2 Y E3 (EN SOLUCIÓN) .....</b>	<b>124</b>
5.8.1.	Tg' y perfil calorimétrico diferencial .....	124
5.8.2.	Perfil reológico y viscosidad .....	126
5.8.3.	Densidad absoluta .....	127
<b>5.9.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE E1, E2 Y E3 (EN LIOFILIZADO ORAL).....</b>	<b>127</b>
5.9.1.	SEM: microscopia electrónica de barrido .....	127
5.9.2.	Tiempo de disgregación para liofilizados orales.....	129
5.9.3.	Fracturabilidad del liofilizado oral .....	129
5.9.4.	Humedad residual: ensayo por Karl Fischer volumétrico. ....	130

5.9.5.	Características organolépticas .....	130
<b>5.10.</b>	<b>ESTUDIO DE ESTABILIDAD: DSV-TGA .....</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>FÓRMULAS DESARROLLADAS .....</b>	<b>137</b>
<b>6.1.</b>	<b>CANTIDADES TEÓRICAS DE CTZ EN LIOFILIZADO ORAL Y % EN MATERIA SECA .....</b>	<b>137</b>
<b>6.2.</b>	<b>PROCESO DE FABRICACIÓN DE LAS REFERENCIAS E1, E2 Y E3. ....</b>	<b>138</b>
6.2.1.	Materias Primas .....	138
6.2.2.	Equipos.....	138
6.2.3.	Proceso de Liofilización.....	138
6.2.4.	Componentes para E1, E2 y E3 al 2% (p/v) de CTZ .....	139
6.2.5.	Flujo y modo de preparación de E1, E2 y E3.....	142
6.2.6.	Método de preparación de los liofilizados orales.....	143
6.2.7.	Controles en proceso .....	144
	<b>DISCUSIÓN GLOBAL.....</b>	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN GLOBAL .....</b>	<b>147</b>
<b>7.1.</b>	<b>DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN .....</b>	<b>147</b>
<b>7.2.</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS FÓRMULAS E1, E2 Y E3.....</b>	<b>150</b>
7.2.1.	En solución.....	150
7.2.2.	En liofilizado .....	151
7.2.3.	Análisis de estabilidad acelerada.....	152
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>181</b>

## **INTRODUCCIÓN**



## **Introducción**

El liofilizado oral es una forma farmacéutica sólida que tiene como objetivo facilitar la administración de un medicamento mediante la disolución instantánea del mismo en la cavidad bucal, con la consiguiente deglución del contenido por vía oral. Dicha forma farmacéutica se obtiene mediante preparación previa de una solución, suspensión o emulsión que contenga el principio activo que se quiere administrar antes de la aplicación de la técnica de liofilización (1).

La liofilización permite generar un producto de tamaño reducido y poroso que se disuelve en segundos cuando se pone en contacto con el agua o con la saliva. En la formulación de un liofilizado oral se utilizan excipientes que auxilian, tanto en la formación de la matriz liofilizada, como en facilitar la correcta disolución del medicamento en la cavidad bucal, añadiéndose componentes que enmascaren el sabor amargo del fármaco y dejen un sabor agradable en la boca (2,3).

Para efectuar este proyecto se ha escogido como principio activo modelo un antihistamínico de segunda generación no sedante administrado generalmente en comprimidos recubiertos y soluciones orales que promueven el alivio de síntomas relacionados con la rinitis alérgica y la urticaria crónica idiopática.

Para el desarrollo de la formulación, se ha puesto a punto previamente un método analítico para el principio activo, seguido de estudios de caracterización del principio activo (Resonancia Magnética Nuclear, Difracción de Rayos X, Espectrofotometría UV-Vis), estudios de preformulación (con técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido y Microscopía de Liofilización) y formulación, con la consiguiente elaboración de la guía de fabricación y controles de proceso.



## **OBJETIVO**



## **OBJETIVO**

El objetivo de este estudio consiste en la investigación y desarrollo de un nuevo medicamento sólido en forma farmacéutica de liofilizado oral que tiene como fármaco modelo un antihistamínico de segunda generación.

Para la consecución de este proyecto, es necesario llevar a cabo una serie de objetivos:

- Investigación de las características químicas, físicas y tecnológicas del principio activo utilizado como modelo (cetirizina dihidrocloruro), con el fin de establecer su calidad y cumplimiento con los criterios de aceptación, tanto de Farmacopea como propios, que aseguren la obtención de un medicamento de calidad, seguro y eficaz
- Diseño de una formulación robusta y adecuada en concordancia con el principio activo y su forma farmacéutica, lo que implica la realización del correspondiente estudio de preformulación en donde se incluya la investigación experimental de la compatibilidad de excipientes con el principio activo
- Establecimiento de la técnica de elaboración más adecuada, lo que implica establecer las condiciones idóneas de elaboración
- Investigación y desarrollo de una nueva metodología analítica indicativa de la estabilidad, adaptada a la nueva formulación, como control de calidad y para los estudios de estabilidad del nuevo medicamento. Por tanto, uno de los objetivos en este trabajo es además el desarrollo de una nueva metodología analítica para el principio activo en conjunto con el estudio de validación correspondiente



## **PARTE BIBLIOGRÁFICA**



## 1. LIOFILIZACIÓN

La liofilización (*lyophilisation* o *freeze-drying*, en inglés) es una técnica de desecación en la que el disolvente (agua, en general) es congelado y eliminado mediante sublimación (4-6). Según Thomas A. Jennings, la palabra liofilización se debe a la porosidad del producto final desecado y su característica “liófila” de reabsorber rápidamente el disolvente y recuperar su estado original. Jennings entiende la liofilización como un proceso estabilizador puesto que una sustancia que se quiera liofilizar debe pasar primeramente por un proceso de congelación, para luego pasar por un proceso de sublimación o secado primario, y por último pasar por un proceso de desorción o secado secundario, a niveles que limitan el crecimiento microbiano o reacciones químicas (6).

Por ello, y considerando la técnica de liofilización como un medio de fabricación de medicamentos, se entiende que la misma se divide en cuatro procesos:

- Formulación, congelación, secado primario o sublimación, y por último, el secado secundario o desorción.

El proceso de liofilización normalmente se aplica teniendo el agua como principal disolvente y para entenderlo, hay que remitirse al diagrama de fases del agua.

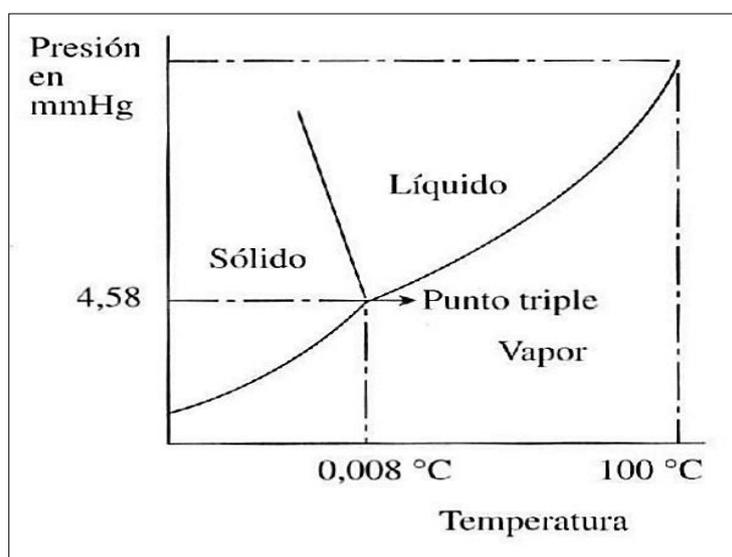


Fig. 1. Diagrama de fases del agua (5).

## 1.1. DIAGRAMA DE FASES DEL AGUA

El diagrama consiste en tres fases separadas, representando cada una de ellas un único estado: sólido, líquido o vapor (ver Fig. 1). Dos fases pueden coexistir a lo largo de una línea, bajo las condiciones de presión y temperatura definidas para cada punto. El punto triple (en adelante, PT) es el punto donde los tres estados del agua (líquido, sólido y vapor) se encuentran en equilibrio dinámico. El diagrama enseña que en condiciones de presión atmosférica de 4,58 mm Hg (= 1 atm) y a 0 °C, el hielo se convierte en agua (licuefacción), y viceversa (congelación). A 1 atm y a 100 °C, el agua se convierte en vapor (evaporación).

Como comentado anteriormente, la liofilización se basa en el proceso de sublimación del hielo. En el proceso de liofilización, si el estado sólido (hielo) se mantiene a una presión inferior al PT (ver Fig. 1), mediante aporte de calor el hielo sufrirá sublimación y pasará directamente del estado sólido al gaseoso (vapor), sin pasar por el estado líquido. De esta manera, la sublimación (o secado primario), ocurre a una temperatura inferior a 0 °C. Eso sólo se puede llevar a cabo si la presión no sube por encima del PT y para asegurarlo, el vapor generado tiene que ser eliminado al instante. Teniendo en cuenta que el proceso de sublimación se lleva a cabo en condiciones de temperatura y presión por debajo del PT, se considera un método idóneo de secado de componentes termolábiles, por ejemplo (4). Una vez comprendido el diagrama de fases del agua, se puede comprender los siguientes pasos del proceso de liofilización, en orden: congelación, secado primario y secundario.

## 1.2. CONGELACIÓN

### 1.2.1. La formación del hielo

La congelación del agua por debajo de 0 °C no ocurre de forma instantánea. Una muestra de agua pura líquida puede congelarse muy por debajo de 0 °C sin formar hielo. En el momento en que un núcleo de hielo se genera, el proceso de congelación empieza rápidamente a través de toda la muestra. Es decir, el punto de “*undercooling*” es la temperatura en la cual la formación de hielo primero tiene lugar cuando una muestra se enfría, y ésta puede presentar una temperatura inferior a 0 °C (7).

### 1.2.2. **El concepto de agua libre y agua ligada**

Al congelarse una muestra de agua y solutos, se puede hablar de los conceptos de agua libre y agua ligada. El agua libre es el agua del medio de disolución que no está unida al soluto, y que puede ser congelada y eliminada mediante sublimación. El agua ligada son moléculas de agua que están unidas al soluto disuelto y tienen movilidad reducida. No se considera el agua ligada como un disolvente de sales o azúcares, y solo puede ser congelada a muy bajas temperaturas, normalmente por debajo del punto de congelación del agua; su densidad es mayor que la del agua libre (porque sus moléculas están más unidas), y no presenta presión de vapor (es decir, las moléculas no consiguen escapar como vapor durante el proceso de sublimación). Por ejemplo, las moléculas de agua ligada se unen a grupos polares e iónicos en moléculas tales como el almidón, pectinas y proteínas (8).

### 1.3. **SECADO PRIMARIO**

#### 1.3.1. **Fases del secado primario**

En el secado primario, se elimina el contenido en agua libre del producto que se quiere desecar (líquido, semisólido, o en suspensión) mediante sublimación. Para ello, se siguen las siguientes fases.

- a) Congelación: el material líquido que se pretende liofilizar debe ser previamente congelado antes de aplicar vacío al ambiente
- b) Vacío: al ambiente donde se encuentra el material congelado se aplica vacío mediante una fuente que sea suficientemente capaz de bajar la presión por debajo del PT y a la vez capaz de remover grandes volúmenes de vapor generados a baja presión durante el secado
- c) Calor: se aplica calor de sublimación, de modo a que el hielo sublime lentamente, generando un sólido poroso que contiene un valor muy reducido de humedad después del secado primario. El calor de sublimación es un parámetro crítico, debido a que un calor insuficiente puede prolongar el proceso, y en exceso puede causar el derretimiento del producto

- d) Remoción del vapor: El vapor generado durante la sublimación tiene que ser constantemente eliminado para evitar un aumento de la presión interna de la cámara, lo que interrumpiría el proceso de sublimación
- e) Velocidad de secado: Es muy lenta, y se elimina el hielo a una velocidad determinada (4, 5)

### 1.3.2. Temperatura eutéctica

Cuando una solución se congela, la cristalización del hielo genera un concentrado de soluto congelado (en inglés conocido con el término “*freeze-concentrate*”) que luego sufre cristalización a una temperatura determinada, conocida como temperatura eutéctica (Te).

### 1.3.3. Temperatura de transición vítrea

Por otro lado, si el soluto se mantiene en un estado amorfo, entonces se puede determinar la temperatura de transición vítrea cuando se alcanza la máxima temperatura de congelación (en adelante,  $T_g'$ ). Es decir, en ausencia de cristalización del soluto, el sistema se encuentra en estado de transición reversible, presentando una consistencia vítrea (con una determinada viscosidad). Por debajo de su  $T_g'$ , debido a una difusión limitada, la formación de hielo se paraliza. Así siendo, el secado primario (sublimación) suele ocurrir a una temperatura de no mínimo 2-5 °C por debajo de la  $T_g'$ .

Es importante conocer la Te y/o la  $T_g'$  del producto que se quiere liofilizar, puesto que si el aporte de calor en el proceso de sublimación (calor de sublimación) sobrepasa dichas temperaturas, el producto puede sufrir el fenómeno llamado **melt-back** (si la mezcla es eutéctica) o de **colapso** si la mezcla es amorfa (9), que generan una pastilla estéticamente indeseada, además de afectar a la estabilidad del producto (10).

## 1.4. SECADO SECUNDARIO

Es la última fase del proceso, donde el agua ligada se elimina por desorción (11). La humedad residual (agua ligada) que está fuertemente adsorbida al producto parcialmente seco, se reduce a un nivel muy bajo, lo que asegura la preservación del producto por un largo tiempo a temperatura ambiente. Este punto normalmente se lleva a cabo aplicando un alto grado de vacío a una temperatura moderada [20-60 °C] (12).

## 1.5. FUNCIONAMIENTO DE UN EQUIPO DE LIOFILIZACIÓN

Básicamente, el ciclo de liofilización aplicado a una solución consiste en una secuencia de tres procesos distintos:

1. Enfriamiento de la solución por debajo de la temperatura de congelación ( $T_g'$ ), para maximizar el contenido en hielo
2. Sublimación del hielo por debajo de la temperatura de congelación ( $T_g'$ ), realizado bajo presión reducida
3. Eliminación por desorción del agua no congelada de la solución solidificada

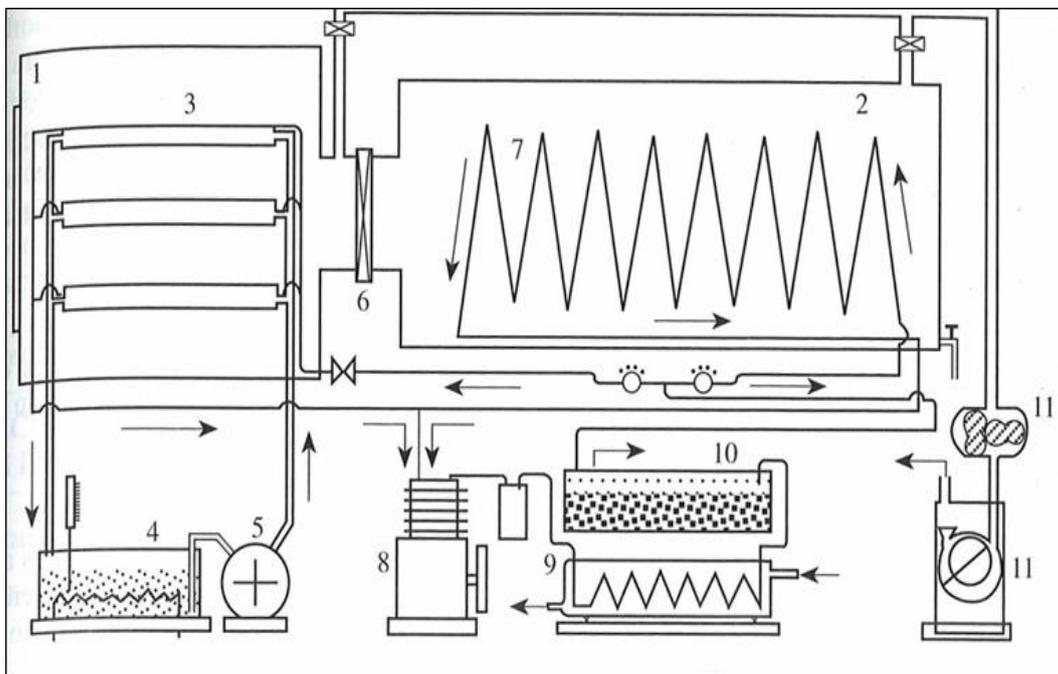


Fig. 2. Esquema general de un liofilizador (5)

El esquema indica:

1. Cámara de liofilización, 2. Cámara de condensación y entre las dos cámaras existe una compuerta que puede aislarlas entre sí, 3. Bandejas calefactadas y refrigeradas, 4. Depósito fluido calefactor, 5. Bomba impulsora, 6. Compuerta de comunicación, 7. Serpentín refrigerado, 8. Compresor, 9. Sistema refrigerante, 10. Depósito fluido refrigerante, 11. Bomba de vacío.

El equipo (ver Fig. 2) presenta un dispositivo de refrigeración, en el cual la solución puede ser enfriada a la temperatura deseada y que permite la sublimación del disolvente bajo una presión reducida. Otro requisito es la presencia de un dispositivo que caliente el material congelado para sublimar el hielo y eliminar el agua residual no congelada, que se encuentra atrapada en el producto solidificado. Finalmente, un condensador elimina y condensa el vapor de agua desde las proximidades del producto solidificado durante el proceso de secado (5).

En la cámara de liofilización (ver Fig. 2) es donde se congela la disolución que se quiere sublimar. Cuando el producto se encuentra congelado se baja la temperatura del condensador a una temperatura inferior a la de la cámara de liofilización. Se conecta el grupo de vacío y se abre la compuerta que comunica la cámara de liofilización con el condensador, de manera que el vapor generado durante la sublimación se condense en la misma. Tras la conexión del equipo de vacío, se puede conectar el equipo de calefacción, que aportará el calor suficiente para el proceso, y siempre que el producto no supere su temperatura eutéctica (o  $T_g'$ ), que es la temperatura de congelación para el producto que se quiere liofilizar. Una vez se termina el proceso de sublimación, empieza el secado secundario que ocurre por desorción, donde se elimina casi totalmente el agua ligada.

## **2. EL LIOFILIZADO ORAL**

### **2.1. CONCEPTO**

Según Farmacopea Europea, la definición de un liofilizado oral (LO) se encuentra dentro de la monografía de comprimidos, siendo considerado una forma farmacéutica sólida que se administra o directamente en la lengua mediante disgregación con la propia saliva o mediante dispersión previa en agua para su posterior administración. En cuanto al test de disgregación utilizado, en el mismo apartado de liofilizados orales se determina un método que consiste en disgregar una unidad en 200 ml de agua purificada a 15-25 °C en menos de 3 minutos. El ensayo debe repetirse seis veces, y cumplir con el requisito del tiempo de disgregación (< 3 minutos) para ser considerado conforme (1).

### **2.2. CARACTERÍSTICAS**

Presentan las ventajas de una forma farmacéutica líquida y sólida a la vez, tales como: dosis única y precisa, buena estabilidad, tamaño de embalaje reducido, facilidad de administración (vía oral). Además, no presentan riesgo de obstrucción gastrointestinal, son fáciles de administrar en el caso de pacientes que presenten dificultad de deglución (disfagia), como pueden ser niños y ancianos (13-15).

Su fabricación consiste en crear una matriz porosa por medio de sublimación del agua de la formulación acuosa previamente congelada del fármaco, que a su vez contiene agentes de carga y otros excipientes como conservantes y aromatizantes (2,3).

De las tecnologías de fabricación para LO, la técnica Zydis® es la más antigua patentada. Se trata de una tecnología que utiliza la liofilización para hacer formas sólidas de rápida disolución o disgregación cuando entra en contacto con la saliva. Son formulaciones que consisten en una combinación de matriz soluble en agua con el fármaco, y que a su vez se dosifican en moldes de PVC o aluminio, y pasan por un proceso de liofilización para eliminar el contenido en agua. Las estructuras resultantes son muy porosas, y se disgregan o se disuelven rápidamente cuando entran en contacto con la saliva (3).

## 2.3. PATENTES DE FABRICACIÓN DE LIOFILIZADOS ORALES

### 2.3.1. Zydis®

La técnica Zydis® consiste en la preparación de una mezcla de principio activo y excipientes hidrofílicos, que se dosifican en blísters; las dosis son liofilizadas y generan una matriz porosa que se disgrega con facilidad tras entrar en contacto con la saliva. Zydis® se adapta a distintos tipos de fármacos, dosis y excipientes. Ejemplos de productos liofilizados mediante esta técnica son: Claritin Reditab® (antihistamínico loratadina) y Feldene Melt® (antiinflamatorio piroxicam) (3).

Según la técnica Zydis®, para formular un LO con principio activo lipófilo, la dosis de fármaco generalmente tiene que ser inferior a 400 mg. Eso es necesario para mantener tanto la estructura porosa del liofilizado oral como su facilidad en disolverse rápidamente. Esa limitación también evita que se perciba el fármaco en la boca mientras el liofilizado oral se disuelve en la saliva.

La dosis para fármacos hidrosolubles es generalmente limitada a un máximo de 60 mg. Además, la dosis depende del comportamiento del fármaco durante el proceso de congelación y secado. Mezclas eutécticas se pueden formar, por ejemplo, y éstas pueden no congelarse adecuadamente o pueden fundirse a determinadas temperaturas alcanzadas durante el proceso de liofilización. Además, el fármaco disuelto puede generar un sólido amorfo vítreo en el paso de congelación, y esta estructura generada puede colapsar durante el secado por sublimación del hielo, causando la pérdida de su estructura de soporte. Este colapso se puede prevenir utilizándose excipientes que generen una estructura cristalina (confiriendo cierta rigidez) en productos amorfos. Otra forma de evitar el colapso en formulaciones con principios activos hidrosolubles es unir el fármaco con una resina de intercambio iónico, generando un complejo insoluble. Para prevenir la sedimentación del material durante la fabricación del comprimido liofilizado, el tamaño de partícula de un fármaco insoluble debería ser inferior a 50 µm. Un tamaño de partícula pequeño es deseable para evitar una textura arenosa en la boca y en la faringe, durante la deglución. No obstante, utilizándose técnicas apropiadas de formulación, se puede desarrollar un producto utilizando un tamaño de partícula de 200 µm (3).

La estabilidad química del fármaco en solución tiene que ser satisfactoria durante un periodo de 24 horas a temperatura ambiente. Es el tiempo requerido para almacenamiento

y dosificación de la solución acuosa o suspensión del fármaco en los pocillos preformados del blíster antes del paso de congelación del proceso de liofilización. El sabor del fármaco tiene que ser agradable. Saborizantes y edulcorantes se utilizan para mascarar el sabor desagradable de los fármacos. Para principios activos muy amargos, resinas de intercambio iónico pueden utilizarse para insolubilizar el fármaco. Para compuestos insolubles, los compuestos amargos pueden ser enmascarados con métodos de microencapsulación (*spray drying*, *spray congealing* o coacervación) (3).

#### 2.3.1.1. Fabricación según técnica Zydis®

- a) El fármaco es disuelto o disperso en una solución acuosa de un polímero (agente de carga), o emulsión. La mezcla se fabrica a peso y se dispensa en los alveolos de los moldes preformados
- b) Las bandejas que cargan con los moldes pasan por un túnel de congelación a base de N<sub>2</sub> (g) para congelar la solución o dispersión de fármaco, y subsiguientemente pasarlas por un liofilizador
- c) Finalmente, los blísters con los liofilizados orales se sellan con una máquina selladora (3)

#### 2.3.2. Quicksolv®

La técnica Quicksolv® es un proceso similar al Zydis®, en el sentido de que consiste en una dispersión acuosa de principio activo y excipientes donde primero se da la forma, y después se congela el producto. La eliminación del agua de la matriz congelada puede hacerse mediante liofilización o sumergiendo la matriz en alcohol (extracción del solvente) para producir una unidad seca. El producto final tiene una apariencia parecida al producto final mediante la técnica Zydis®, con una porosidad homogénea y una consistencia adecuada para la manipulación. Ejemplos de productos fabricados mediante la técnica Quicksolv® es el Propulsid Quicksolv® de la empresa Janssen Pharmaceuticals, un LO de cisaprida monohidrato, un agente procinético gastrointestinal, y Risperdal M-Tab® (Risperidona, un antipsicótico) (16).

#### 2.3.3. Lyoc®

La técnica Lyoc® (Laboratories L. Lafon), genera una forma sólida y porosa obtenida mediante la liofilización de una emulsión O/A dosificada directamente en los pocillos de un blíster. Para prevenir la ocurrencia de falta de homogeneidad por sedimentación

durante el proceso de liofilización, se necesita que el agente de carga no disuelto se encuentre en una proporción superior para que se incremente la viscosidad de la suspensión. Esta característica hace que se reduzca la porosidad del comprimido, lo que hace que la disgregación sea más lenta. Una desventaja de esta técnica es que la forma farmacéutica sólida final presenta propiedades mecánicas pobres. Un ejemplo de producto fabricado con esta técnica es el Phloroglucinol hydrate (Spasfon Lyoc<sup>®</sup>), un antiespasmódico (16).

#### 2.4. LOS EXCIPIENTES DE UN PRODUCTO LIOFILIZADO

Los excipientes son el principal componente del producto liofilizado porque aumentan significativamente el contenido total de sólidos, la densidad aparente del producto seco, y confieren resistencia frente a una posible rotura mecánica. Los excipientes, además de conferir un reclamo estético al producto en términos de una buena estructura de pastilla, ayudan a desarrollar un proceso de liofilización robusto y económico. Un excipiente que cristalice actúa de esa manera, sin afectar a la estabilidad química de los componentes de la formulación. Un excipiente amorfo, por otro lado, reduce la cantidad de hielo producido y por lo tanto el grado de concentración por congelación. En la práctica, esto auxilia en acortar el tiempo de secado primario (sublimación). Sin embargo, aumenta el tiempo de secado secundario (10).

En cuanto al papel desempeñado por los excipientes en la determinación de las transiciones vítreas del concentrado de congelación y del producto final liofilizado: los excipientes que presenten una  $T_g'$  alta permiten la ejecución de ciclos más cortos de liofilización, puesto que elevan la temperatura máxima segura para la sublimación del hielo. Además, cualquier excipiente que aumente la  $T_g'$  del producto que se quiere liofilizar elevará la temperatura máxima de almacenamiento (7).

##### 2.4.1. El estado físico de los solutos

La selección y concentración de los excipientes en el medicamento son generalmente indicadas por las propiedades del principio activo, incluyendo su estabilidad fisicoquímica. El estado físico de los excipientes es un factor crítico al determinar su funcionalidad. Mientras agentes de carga como son el manitol y la glicina se requieren en

su forma cristalina, soluciones reguladoras y estabilizantes son preferibles en estado amorfo (9).

Mientras el estado físico de los solutos en sistemas congelados influye en las condiciones de secado primario y secundario, también puede influenciar en la vida útil y en el rendimiento del producto liofilizado. Si en una solución congelada, el soluto se cristaliza como un hidrato, su mantenimiento en el estado cristalino en el liofilizado final no es garantizada. Durante el proceso de secado, el hidrato puede sufrir deshidratación a una forma anhidra cristalina o parcialmente cristalina.

La existencia de un principio activo en su forma cristalina puede mejorar la estabilidad química del mismo. Sin embargo, el tiempo de reconstitución (tiempo de disolución) del principio activo en el estado amorfo es generalmente inferior que en su forma cristalina. Ese factor es importante cuando el principio activo tiene una solubilidad limitada en el vehículo utilizado para su reconstitución. Con lo cual, lo que define el estado sólido del principio activo en la forma farmacéutica liofilizada es la interacción entre la estabilidad química del principio activo durante el almacenamiento y el tiempo de disolución de los componentes de la formulación durante la reconstitución (9).

#### 2.4.2. **Aplicación de los excipientes para formulaciones liofilizadas**

Los excipientes pueden ejercer diferentes aplicaciones en un producto liofilizado, tales como:

- Regular el pH, si necesario, mediante soluciones reguladoras de pH
- Asegurar la isotonicidad de la solución reconstituida en el momento de su uso, como una solución salina
- Conferir protección química durante el proceso de liofilización de un componente bioactivo
- Conferir estabilidad a largo plazo del producto seco
- Generar resistencia mecánica mejorada (agente de carga) de la forma farmacéutica liofilizada
- Evitar la pulverización del producto liofilizado
- Disminuir el efecto degradante del agua residual

- Alcanzar mejorías en el proceso de liofilización, por acortar tiempos y disminuir los costes de fabricación

Tabla 1.Excipientes utilizados en formas liofilizadas y sus aplicaciones (9)

AGENTES DE CARGA	
Azúcares	Manitol, lactosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol, glucosa, rafinosa
Aminoácidos	Arginina, glicina, histidina
Polímeros	Dextranos, polietilenglicol
Soluciones reguladoras de pH	Ácido cítrico, citrato potásico, citrato sódico, ácido tartárico, fosfato sódico, tris base, tris HCl, tris acetato, cloruro de zinc, acetato sódico, acetato potásico, arginina, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, meglumina
AGENTES SOLUBILIZANTES	
Agentes complejantes	EDTA, alfa ciclodextrina, hidroxipropilβciclodextrina
Tensioactivos	Polisorbato 80
Cosolvente	Tercbutil alcohol, isopropilalcohol, diclorometano, etanol, acetona, glicerol
VARIOS	
Agentes tonificantes	Cloruro sódico, sacarosa, manitol, dextrosa
Agente antimicrobiano	Alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabén y etilparabén
Modificador de temperatura de colapso	Dextrano, hidroxietilalmidón, ficoll y gelatina

#### 2.4.2.1. Agentes de carga

Los agentes de carga sirven para incrementar el contenido sólido total de la formulación, y a crear así una matriz de estructura firme. Además, deben presentar facilidad de redispersión cuando el producto entra en contacto con agua o saliva, por ejemplo, en el caso de los liofilizados orales.

El agente de carga puede ser un sólido cristalino y/o amorfo al final del proceso de liofilización. La cristalización del agente de carga, no obstante, puede afectar adversamente a la estabilidad física del producto, salvo cuando se requiera un agente de carga amorfo (7).

#### 2.4.2.2. Crioprotectores

Se entiende por crioprotector el excipiente que protege el producto que se quiere liofilizar de sufrir degradación durante el proceso de congelación. El crioprotector facilita la formación de la matriz vítrea; además, confiere fuerza física a la matriz por aumentar el contenido sólido del liofilizado. Compuestos polihidroxilados como son azúcares (mono, di-, polisacáridos), polialcoholes y derivados, y péptidos ayudan a generar una forma vítrea. Los péptidos presentan transiciones vítreas inferiores a las adquiridas con los compuestos polihidroxilados, posiblemente debido a la naturaleza zwitteriónica (7).

Los requerimientos para un crioprotector efectivo son:

- Compatibilidad química con otros componentes de la formulación, tanto en solución como en el estado sólido
- Adecuada solubilidad en agua y miscibilidad con otros componentes de la mezcla
- Ausencia de separación de fases durante el proceso de congelación o después
- Ausencia de reacciones químicas deletéreas que tengan que ver con los excipientes durante la concentración generada por la congelación, como puede ser la glicación de péptidos
- Temperaturas de transición vítrea idóneas para el proceso y almacenamiento
- Niveles aceptables de eliminación *in vivo*

#### 2.4.2.3. Reacciones de Maillard

La reacción de Maillard es una reacción química no enzimática que ocurre entre componentes carbonilo, especialmente azúcares reductores y compuestos que presenten grupos amino libre, tales como aminas, aminoácidos y proteínas. Esta reacción química ocurre durante un proceso de calentamiento del producto o durante su almacenamiento prolongado, y se considera un proceso de deterioro. Las variables que pueden afectar al grado de la reacción de Maillard son la temperatura y el tiempo, que a su vez dependen de las condiciones del proceso, al igual que el pH, actividad del agua, el tipo y la disponibilidad de los reactivos. La reacción de Maillard que pueda ocurrir durante un proceso de secado puede ser desfavorable para el producto final. Puesto que la temperatura y el tiempo son los dos factores más importantes que influyen en la reacción de Maillard, la reducción de la carga térmica al que un producto estará expuesto durante el proceso de fabricación es un factor clave en la extensión de la reacción (17,18).

#### 2.5. LA MATRIZ DEL LIOFILIZADO ORAL

Según el estudio de Seager et al. (3), la matriz de un LO consiste en uno o más componentes (en general más de uno) que deben asegurar el mantenimiento de la formulación. El primer componente puede ser: gelatina, dextranos, alginatos y maltodextrinas, siendo éstos responsables de mantener la forma y conferir fuerza mecánica a los liofilizados orales (función de aglutinantes). El segundo constituyente es un agente que mejora la disgregación como puede ser la sacarosa y el manitol (polialcohol), actuando por cementación de la estructura porosa proporcionada por el polímero soluble en agua y acelerando la disgregación del liofilizado oral. Como segundo componente de la formulación, además de la sacarosa y del manitol, también se utilizan aminoácidos como agentes de soporte de la matriz, en su forma L (levógira), también utilizados en otras formas farmacéuticas liofilizadas, como crioprotectores y agentes de carga (glicina, por ejemplo) (3).

La formulación también contiene edulcorantes, saborizantes, sustancias para el ajuste del pH tales como el ácido cítrico o el hidróxido sódico que se utilizan para optimizar la estabilidad química del fármaco, minimizar la solubilidad de los componentes insolubles en agua u optimizar el grado de ionización del fármaco absorbido en el torrente sanguíneo

a través de las membranas pre gástricas; conservantes como los parabenos que aseguran la estabilidad de la suspensión del fármaco en la fabricación del LO, paso previo a la liofilización.

Potenciadores de la permeación como es el lauril sulfato sódico optimizan la administración transmucosa de fármacos absorbidos a través de los tejidos pre gástricos. Agentes de suspensión o floculantes, o ambos, por ejemplo la goma xantana, previenen la sedimentación de partículas del fármaco dispersas en el proceso de fabricación; protectores de la formulación que eviten el colapso de la misma como es la glicina (aminoácido), que además previenen la contracción de las unidades liofilizadas durante el proceso de liofilización o durante un largo periodo de almacenamiento. Además de edulcorantes y saborizantes, se utilizan también polímeros de microencapsulación (como celulosas) para enmascarar el sabor amargo de los fármacos, así como resinas de intercambio iónico (tales como resina de amberlita), y colorantes, que confieren un factor de identificación. Finalmente, las formulaciones liofilizadas son fabricadas y acondicionadas en PVC (polivinil cloruro) o PVDC (polivinil dicloruro) de plástico, o pueden ser envasadas en láminas de Aclar® o de aluminio, para proteger el producto de la humedad exterior (3).

## 2.6. AGENTES DE CARGA PROPUESTOS PARA LA FORMULACIÓN

Tras verificación de los agentes de carga más utilizados en las formulaciones de LO y sus atributos, se han propuesto dos agentes de carga para el estudio de desarrollo del LO de CTZ: el polialcohol manitol y el polímero hidrofílico PVP K30.

### 2.6.1. Manitol

El manitol es un polialcohol obtenido a partir de la hidrogenación de la manosa (por reducción de un grupo carbonilo). Presenta sabor dulce y un calor de disolución negativo (genera un efecto refrescante en la boca). Tiene la ventaja de ser no cariogénico, puesto que no sufre fermentación rápida en la boca, como sí ocurre con la sacarosa. De esa manera, es utilizado en la fabricación de chicles, soluciones (*spray* oral) para el aliento, u otros productos que requieren mantenerse en la cavidad bucal por un largo periodo de

tiempo (20). Se trata de un polvo blanco, cristalino, no higroscópico, y que puede presentar polimorfismo (21). En formulaciones para formas farmacéuticas orales se utiliza como diluyente (10-90% p/p), mientras que para formulaciones liofilizadas se utiliza como agente de carga (20-90% p/p) por generar una pastilla liofilizada rígida y elegante, además de presentar buena redispersión (21).

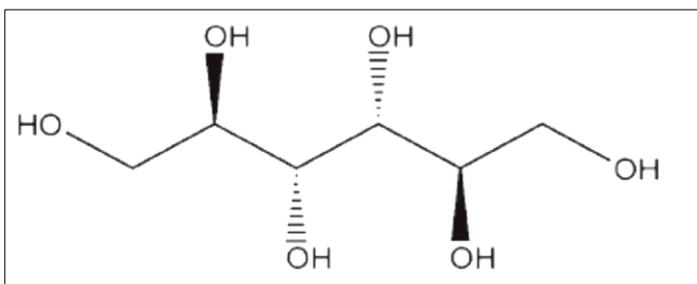


Fig. 3. Fórmula estructural del manitol (19).

Al formularse un LO con un principio activo soluble en agua, se debe tener en cuenta que dichos principios activos pueden producir mezclas eutécticas con Tg's muy bajas y la formación de sólidos vítreos que pueden sufrir colapso durante el secado debido a la pérdida de estructura de soporte durante el proceso de sublimación. Una manera de evitar el colapso durante la liofilización es el uso de manitol en la fórmula (22).

Dentro de las ventajas que presenta este excipiente, están las siguientes características:

- a) Manitol confiere una estructura sólida a la pastilla liofilizada
- b) Facilita la sublimación (secado primario) durante la aplicación de vacío
- c) No es un excipiente higroscópico
- d) Presenta facilidad de reconstitución
- e) Aporta rigidez al compuesto amorfo al generar cristalinidad al liofilizado
- f) Genera una pastilla liofilizada con una alta temperatura de colapso y confiere estabilidad y elegancia a la estructura formada (23-28)

Dentro de sus desventajas, según estudio de Ursino et al., 2011 (27):

- a) En el caso de preparaciones farmacéuticas intravenosas se han reportado reacciones de hipersensibilidad en formulaciones con 10 -20% (p/v) de manitol. Cuando es

administrado por vía oral, las formulaciones no ultrapasan la concentración de 20% (p/v), y en general no presentan efectos adversos, salvo diarrea osmótica

- b) En cuanto a la estabilidad de la formulación: el excipiente presenta polimorfismo. Puede presentar tres estados polimórficos cuando se cristaliza ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  manitol), así como también puede desarrollarse en su forma hidrato. Como hidrato, el agua ligada puede liberarse durante el periodo de almacenamiento, lo que compromete la estabilidad del medicamento. Se procura evitar la formación del manitol hidrato durante el proceso de liofilización
- c) En el proceso de liofilización, la formación de manitol hidrato puede ser influenciada tanto por el proceso de congelación como por el secado, además de también ser influenciada por la naturaleza estocástica (aleatoria) de la temperatura de congelación atribuido al fenómeno de undercooling
- d) Según estudio de Hawe and Frieß, 2006 (28) se ha visto que según la temperatura de annealing aplicada a una misma formulación que contiene manitol 4% (p/v) y sacarosa 1% (p/v), se puede generar  $\delta$ -manitol (forma más estable de manitol), o generar la forma de manitol hemidrato (forma inestable). Cuando el manitol se encuentra en forma de hidrato, es necesario eliminar el agua completamente durante el proceso de liofilización, para que la liberación de agua no ocurra durante el periodo de almacenamiento del producto. Es decir, que no ocurra liberación de agua de hidratación y consiguiente depresión de la Tg' del producto, lo que comprometería su estabilidad

Pese a que presenta la posibilidad de generar polimorfismo en el proceso de liofilización, las ventajas que presenta el manitol lo hacen parte de la composición de muchos liofilizados orales (ver Tabla 2). Por ello, lo hemos considerado como uno de los excipientes propuestos para el desarrollo de la formulación del liofilizado oral de cetirizina dihidrocloruro.

Tabla 2. Ejemplo de liofilizados orales comercializados a día de hoy

LABORATORIO TITULAR	PRODUCTO COMERCIAL	PRINCIPIO ACTIVO	FORMA FARMACÉUTICA	DOSIS	COMPOSICIÓN EXCIPIENTES
Merck Sharp & Dohme	Maxalt	Rizatriptán benzonato	Liofilizado oral	10 mg	Aspartamo, equivalente a 1-2 mg de fenilalanina
GSK	Zofrán melt	Ondansetrón	Liofilizado oral	4 y 8 mg	Aspartamo, gelatina, manitol, metilbenzoato sódico, propilbenzoato sódico, aromatizante de fresa
ALK Abelló Ltd (UK)	Grazax	Extractos de pólen	Liofilizado oral	75,000 SQ-T	Gelatina, manitol, hidróxido sódico
Shering Plough, UK	Zubrin	Tepoxatin	Liofilizado oral para perros	30, 50, 100 y 200 mg	Gelatina y manitol
UCB Pharma SA	Seglor Lyoc	Dihidroergotamina	Liofilizado oral	5 mg	Dextrano, gesweet (edulcorante), manitol E421
Ferring Pharmaceuticals A/S	Minirinmelt	Desmopresina acetato	Wafer sublingual	60, 120 y 240 µg	Gelatina, manitol, ácido cítrico anhidro
Cephalon (Francia)	Spasfon Lyoc	Phologlucinol (antiespasmódico)	Liofilizado oral	80 mg	Dextrano 70, manitol, macrogol 15, sucralosa
Schering-Plough Europe	Aerius	Desloratadina	Liofilizado oral	5 mg	Gelatina tipo B, manitol, aspartamo, polacrilin potassium, red dye opatint, aroma tutti frutti, ácido cítrico anhidro y agua purificada, PVC (envase)
Mc Neil products Ltd (UK)	Imodium instants	Loperamida	Liofilizado oral	2 mg	Gelatina, manitol, aspartamo, aroma de menta e hidrógeno carbonato sódico
Almirall, SA (España)	Ebastel flas	Ebastina	Liofilizado oral	10 y 20 mg	Aspartamo E-951, gelatina E-441, manitol E-421, aroma de menta

Tabla 3. Excipientes comúnmente utilizados en la elaboración de LO (19)

<b>EXCIPIENTES</b>	<b>FUNCIÓN EN MATRIZ</b>	<b>NATURALEZA QUÍMICA</b>
Manitol	Disgregante/soporte; edulcorante. Confiere cristalinidad y dureza, rigidez	Polialcohol
Aspartamo	Edulcorante, agente de carga	Edulcorante a base de péptidos (contiene fenilalanina)
Maltodextrinas	Agente de carga. Genera estructura cristalina amorfa; forman complejos estables solubles en agua	Polímero de glucosa
Goma xantana	Agente de suspensión/floculante	Polisacárido aniónico incompatible con tensioactivos catiónicos, polímeros o conservantes (evitando precipitación)
Gelatina	Agente de carga, aglutinante, agente de suspensión	Naturaleza proteica de origen animal. Confiere estructura y flexibilidad
Hidroxietilcelulosa	Aglutinante, viscosizante, agente de suspensión	Derivado de la celulosa no iónico, soluble en agua
Glicina	Agente de carga. Crioprotector	Aminoácido
Alginatos (ácido algínico)	Agente de carga. Estructura cristalina amorfa	Polisacárido aniónico
Sacarosa	Disgregante /soporte	Disacárido
Sucralosa	Edulcorante	Derivado de la sacarosa, no cariogénico

### 2.6.2. PVP

La polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero de carácter hidrófilo que se obtiene por la polimerización mediante radical libre de vinilpirrolidona en agua o en 2-propanol, obteniéndose la estructura en cadena (29).

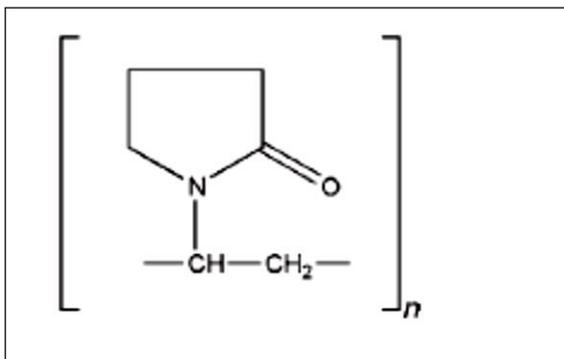


Fig. 4. Fórmula estructural del PVP (19).

Se utiliza como aglutinante en formas farmacéuticas sólidas, y como solubilizante en formulaciones orales y parenterales. En formulaciones líquidas vía oral, el PVP se utiliza como agente dispersante y de suspensión de fármacos; además se utiliza como formador de *films* para soluciones oftálmicas. Además, también está presente en formulaciones de líquidos aromatizantes y comprimidos masticables, y presenta función adhesiva en sistemas transdérmicos (19, 29).

Existen varios grados de PVP, desde el K12 hasta el K120, por ejemplo. K12 y K17 son PVP despirogenizados, que pueden ser usados en formulaciones liofilizadas parenterales, mientras que K25, K30, K90 y K120, por ejemplo, se utilizan en formulaciones de soluciones orales y/o formas farmacéuticas sólidas. Según el grado K (peso molecular) del PVP, se observa un incremento en la viscosidad de la solución. Pese a ser un excipiente hidrofílico, se debe incorporar a la solución que se pretende preparar en pequeñas porciones y con una agitación vigorosa del medio disolvente, para evitar generar grumos. Los grumos de PVP tardan mucho en disolverse completamente (19, 29).

Dentro de las ventajas del uso del PVP en formulaciones liofilizadas, tenemos:

- a) El uso del PVP K12 en preparaciones liofilizadas parenterales, como es el producto Alkeran (nombre comercial del citostático dihidrocloruro de Melphalan, mostaza L-fenilalanina), insoluble en agua (30)

- b) El uso del PVP para incrementar la tasa de disolución y/o la solubilidad de fármacos poco solubles (31-37)
- c) Se le considera un excipiente con característica crioprotectora (protege el producto que se quiere liofilizar de una posible degradación en el proceso de congelación) y estabilizadora de polvos liofilizados, tratándose de almacenaje de larga duración (38)
- d) La adición de PVP a una formulación que contenga otros excipientes aumenta la resistencia a la fracturabilidad de una pastilla liofilizada. Se menciona el uso del PVP en el capítulo Product Formulation de T. Jennings: “(...) en el caso del manitol, la fuerza necesaria para fracturar una pastilla de una solución de 0,25 M de manitol era de 175 gramos. En el caso de una pastilla de PVP al 1,4%, se requiere una fuerza de fracturabilidad de 142 gramos, pero la pastilla liofilizada presenta una contracción en su estructura. La real ventaja de este excipiente, es cuando se le utiliza en conjunto con otro excipiente. La adición de 0,8% PVP a una formulación conteniendo manitol o glicina aumentó la resistencia de la pastilla en un factor de 3 a 25 veces y ha producido pastillas de estructura y color uniformes, y sin contracción añadida” (6)
- e) El uso del PVP en formulaciones de liofilizados puede auxiliar en aumentar la  $T_g$ , lo que mejoraría el proceso de liofilización. Por ejemplo, la adición de 100 mg/ml de PVP en una Solución de 20% de L-Dopa mejoró la  $T_g$  de  $-21,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (sin PVP) a  $-9,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (con PVP) (39)

Las desventajas del PVP:

- En su síntesis se pueden generar niveles de peróxidos que pueden causar incompatibilidades, tales como: oxidación atribuida a los peróxidos, adición nucleofílica de aminoácidos y péptidos, hidrólisis de fármacos debido a la humedad (40-43)

De igual manera que el PVP puede auxiliar en subir la  $T_g$ , su uso también puede bajar la misma, según la humedad relativa (%HR). El estudio de Imamura et al (2008) menciona que existe una relación entre PVP,  $T_g$  y %HR. El estudio utiliza combinaciones de tres tipos de PVP (PVP 40K, 360 K y 1000 k) con el azúcar trehalosa. Se verifica que la mezcla entre azúcar-polímero presenta un carácter amorfo (en DSC no presentan picos

de cristalización) y una unión entre moléculas mediante puentes de hidrógeno. Cuando la matriz se encuentra deshidratada (0%HR) hay un aumento de la  $T_g'$ . A 11%HR, hay una disminución de la  $T_g'$  por efecto de la hidratación del medio (debido a un aumento en el número de grupos hidroxilo en el sistema, y al efecto plástico del agua). A medida que la %HR sobrepasa el 11% (alcanzando un 23%HR), la hidratación de la matriz se vuelve menos significativa en cuanto a la  $T_g'$  de la mezcla, y ésta vuelve a subir (44).

Teniendo en cuenta que la formulación estudiada tiene por objetivo la vía de administración oral, se decide utilizar el PVP K30 como segundo excipiente propuesto en el estudio de desarrollo del liofilizado oral.

### 3. CETIRIZINA DIHIDROCLORURO

Cetirizina dihidrocloruro (CTZ) es un antihistamínico H<sub>1</sub> de segunda generación, no sedante. Es el metabolito mayoritario del antihistamínico hidroxizina. Su actividad farmacológica reside en su isómero (-R) (45,46). Es un derivado piperazínico. Se administra en el tratamiento sintomático de la rinitis alérgica perenne y estacional, urticaria crónica idiopática (47-50).

#### 3.1. ESTRUCTURA MOLECULAR Y GRUPOS REACTIVOS

La CTZ es un antihistamínico de acción prolongada ((*RS*)-2-[2-[4-[(4-Chlorophenyl) phenylmethyl] piperazin-1-yl] ethoxy]acetic acid dihydrochloride). Derivado piperazínico, se genera tras oxidación del grupo hidroxilo (-OH) de la hidroxizina (antihistamínico de primera generación) generándose un grupo carboxilo (-COO<sup>-</sup>) (45, 46).

La molécula de CTZ presenta un acentuado carácter polar que dificulta su paso a través de la barrera hematoencefálica, lo que reduce los efectos sedantes que presenta la molécula de hidroxizina, por ejemplo (47).

La CTZ presenta dos grupos funcionales: una amina terciaria alifática y un ácido carboxílico, confiriéndole un carácter anfotérico.

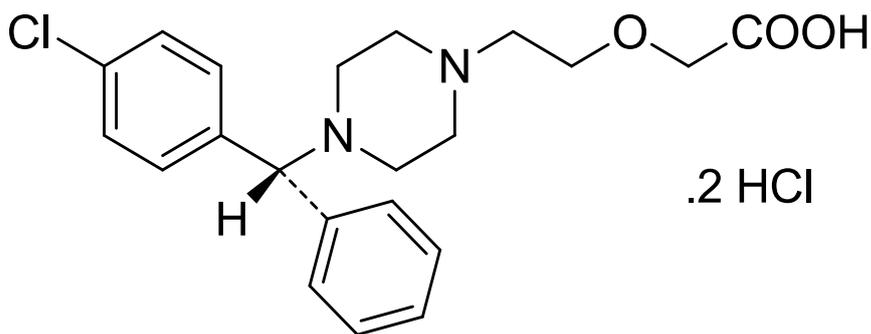


Fig. 5. Estructura molecular del dihidrocloruro de cetirizina (51).

### 3.2. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y ORGANOLÉPTICAS

Según Farmacopea Europea (51), estas son las características fisicoquímicas y organolépticas del principio activo:

Contenido en sustancia seca-anhídrica: 99% a 100,5%

Peso molecular: 461.8 g/mol

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$

Solubilidad: libremente soluble en agua, prácticamente insoluble en acetona y en cloruro de metileno

Apariencia: polvo blanco o casi blanco

### 3.3. FARMACOLOGÍA

#### 3.3.1. Mecanismo de acción

Es un antagonista periférico selectivo del receptor  $H_1$ , de efecto prolongado. Presenta una polaridad incrementada en comparación con la polaridad de la hidroxizina, lo que puede disminuir la distribución del fármaco por el SNC, explicando su potencial reducido de efectos secundarios del SNC

No obstante, parece ser que la incidencia de algunos efectos secundarios en el SNC (por ejemplo, somnolencia) es mayor en pacientes que reciben CTZ que en los pacientes que reciben otro tipo de antihistamínicos de segunda generación, como es la loratadina (45,46).

#### 3.3.2. Indicaciones terapéuticas

Se administra en el tratamiento sintomático de la rinitis alérgica perenne y estacional, urticaria crónica idiopática, en adultos y niños (47-50). El efecto antihistamínico de CTZ (medido por la supresión de pápula y eritema inducido por una inyección intradérmica de histamina) es comparable con la del astemizol y terfenadina (que ya no se comercializan), clemastina, clorfeniramina, difenidramina, hidroxizina, loratadina, pirilamina.

El fármaco exhibe un antagonismo específico y selectivo de los receptores de histamina  $H_1$ , con efectos inhibitorios en la fase aguda inicial de la respuesta inmediata de hipersensibilidad, mediada por la acción de los receptores  $H_1$  (46, 47).

### 3.3.3. Metabolismo e interacciones farmacológicas

CTZ es metabolizada mínimamente en el hígado, y la mayor parte es excretada sin cambios por los riñones (orina). El fármaco tiene un potencial bajo para efectos secundarios generados por interacción con sistemas enzimáticos metabólicos (46).

#### 3.3.3.1. Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)

Debido a que los inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (IMAO) (como son los antidepresivos selegilina, fenelizina, por ejemplo) potencian los efectos presores de los fármacos simpaticomiméticos (por ejemplo, pseudoefedrina), una combinación predeterminada de comprimidos de liberación prolongada con CTZ y pseudoefedrina está contraindicada en pacientes que reciban un IMAO, o durante dos semanas después de interrumpir un tratamiento con un IMAO (46).

#### 3.3.3.2. Fármacos que afectan a enzimas microsomales hepáticas

La administración concomitante de CTZ con fármacos que reconocidamente inhiben las enzimas microsomales del citocromo P-450 (por ejemplo, azitromicina, eritromicina, cetoconazol) no se asocia con cambios clínicos importantes en los parámetros de ECG (por ejemplo, el intervalo QTc), e interacciones clínicamente importantes no han sido informadas en el caso de pacientes que reciban CTZ al mismo tiempo que azitromicina, eritromicina o cetoconazol (46).

#### 3.3.3.3. Depresores del Sistema Nervioso Central

El uso concomitante de CTZ con depresores del SNC (por ejemplo, alcohol, sedantes, tranquilizantes) puede resultar en un efecto adicional de depresión del SNC (por ejemplo, puede aumentar la somnolencia). Por lo que el uso concomitante de este antihistamínico con depresores del SNC se debe evitar (46).

### 3.4. POSOLOGÍA Y MODO DE ADMINISTRACIÓN

Comprimidos recubiertos: Por vía oral, para adultos y adolescentes a partir de los 12 años, se recomienda una dosis de 10 mg/día (un comprimido recubierto). Para niños de entre 6-12 años, se recomienda la administración de 5mg/12 horas (medio comprimido recubierto cada 12 horas) (52).

Gotas orales en solución 10 mg/ml: 1 ml de solución contiene 10 mg de CTZ, una gota de solución contiene 0,5 mg de CTZ.

- Niños de 2-6 años: 2,5 mg dos veces al día (5 gotas dos veces al día).
- Niños de 6-12 años: 5 mg dos veces al día (10 gotas dos veces al día).
- Adultos y adolescentes mayores de 12 años: 10 mg una vez al día (20 gotas) (52).

Para pacientes adultos con insuficiencia renal moderada con un nivel de aclaramiento renal en torno a 30-49 ml/min se recomienda administrar 5 mg/día. Para pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento renal inferior a 30 ml/min) se recomienda administrar 5 mg/48 horas. En el caso de niños que presenten insuficiencia renal, se debe hacer un ajuste individual conforme su edad y peso.

Existe en forma de comprimidos masticables de 10 mg y en cápsulas. En el mercado español se comercializa en comprimidos recubiertos de 10 mg, soluciones orales de 1 mg/ml y gotas orales en solución de 10 mg/ml (46, 52).

### 3.5. CONTRAINDICACIONES

No se debe administrar CTZ a pacientes que presenten hipersensibilidad a los derivados piperazínicos (como puede ser la hidroxizina), y a pacientes que presenten insuficiencia renal grave (aclaramiento renal inferior a 10 ml/min) o pacientes terminales.

En el caso de la combinación de CTZ con pseudoefedrina, está contraindicada la administración concomitante entre dicha combinación y un inhibidor de la monoaminoxidasa (IMAO) por potenciar los efectos simpaticomiméticos de la pseudoefedrina (descongestionante nasal) (46).

### 3.6. EFFECTOS SECUNDARIOS Y PRECAUCIONES

A dosis altas, puede causar efectos en el SNC relacionados con la dosis ingerida, en adultos. La CTZ, así como los antihistamínicos no sedantes en general, tiene que ser administrada con precaución en pacientes que presenten insuficiencia renal o hepática (46).

### 3.6.1. Efectos hepáticos

Elevaciones transitorias y reversibles de transaminasas pueden producirse durante tratamiento con CTZ. Además, hepatitis con elevaciones sustanciales de transaminasas y bilirrubina se asocian con el uso de CTZ (46).

### 3.6.2. Efectos en el SNC

CTZ a la dosis recomendada tiene reacciones adversas menores sobre el SNC, incluyendo somnolencia, fatiga, mareo y dolor de cabeza.

*In vitro*, CTZ exhibe una afinidad por los receptores H<sub>1</sub>-histaminérgicos del cerebro y de los tejidos periféricos. Sin embargo, *in vivo*, a diferencia de los prototipos antihistamínicos de primera generación, CTZ no es capaz de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, probablemente debido a la polaridad del fármaco, es decir, no parece interactuar apreciablemente con los receptores H<sub>1</sub> en el SNC, a dosis habituales.

En algunos ensayos clínicos, la incidencia de efectos en el SNC (ejemplo, somnolencia) fue mayor en pacientes que recibieron CTZ que en los pacientes que recibieron placebo. Además, hay datos que indican que la incidencia de otros efectos en el SNC (disturbios en el ECG, funcionalidad psicomotora afectada) puede ser mayor en pacientes que reciban CTZ que en pacientes que reciban otro tipo de antihistamínicos de segunda generación (por ejemplo, loratadina).

En parte, hay estudios que indican que los efectos secundarios del SNC causados por CTZ pueden ser el resultado del uso del mismo en altas dosis; mientras que otros estudios indican que los efectos del SNC causados por el fármaco en cuestión no difieren de los efectos con placebo u otro tipo de antihistamínicos de segunda generación (como el astemizol) o, alternativamente, no se han informado efectos adversos del SNC con el fármaco.

No obstante, hay ensayos clínicos con pacientes que han recibido 5 ó 10 mg diarios del fármaco o del placebo, donde la incidencia general de somnolencia fue de 13,7 o 6,3% en pacientes que recibieron CTZ o placebo, respectivamente (46).

### 3.6.3. **Efectos en el sistema respiratorio**

Casos de sequedad de boca, faringitis, tos, broncoespasmo, bronquitis, disnea, hiperventilación, rinitis, pólipos nasales, han sido reportados tras administración de CTZ y placebo en ensayos clínicos. Sin embargo, no hay un estudio que indique relación causal entre los síntomas mencionados y la administración de CTZ.

En animales, la CTZ inhibe la resistencia de entrada de aire por vía nasal, que es inducida por la histamina; y tal inhibición parece ser comparable con la clorfeniramina. En pacientes con asma moderada, dosis de 5 a 20 mg de CTZ tuvieron efecto protector en contra de broncoespasmo inducido por histamina nebulizada. CTZ por vía oral puede atenuar substancialmente disminuciones del Volumen de Expiración Máxima (VEM) inducidas por histamina. CTZ también presenta un efecto protector contra broncoespasmos inducidos por alérgenos en pacientes con asma alérgica (46).

### 3.6.4. **Efectos en tracto gastrointestinal**

Casos de dolor abdominal, diarrea, vómitos han sido reportados tras ensayos clínicos con CTZ y placebo, sin que haya un estudio que indique relación causal entre los síntomas y la administración de CTZ (46).

### 3.6.5. **Efecto cardiovascular**

Pese a que efectos secundarios cardíacos, que incluyen fibrilación ventricular o muerte asociada con un intervalo QT prolongado y arritmia ventricular atípica (*torsade de pointes*), han sido informados en pacientes que recibieron dosis de otro tipo de antihistamínicos (astemizol y terfenadina), la administración de CTZ a adultos sanos con dosis hasta 60 mg diarios (6 veces la dosis máxima diaria) durante 1 semana no fue asociada con prolongación del intervalo QT (53-55).

### 3.6.6. **Efectos dermatológicos y de sensibilidad**

Tras administración de CTZ, se han reportado casos de reacciones de hipersensibilidad al fármaco, que pueden manifestarse como urticarias y erupciones fijas. El acné, dermatitis, piel seca, eczema, erupción cutánea (que puede ser eritematosa), urticaria, trastorno de la piel, nódulos de la piel, furunculosis, hiperqueratosis, hipertrichosis, alopecia, seborrea, prurito, púrpura, reacciones de fotosensibilidad (que puede ser tóxica), o angioedema

también han sido reportados. Sin embargo, no ha sido establecida una relación causal con el fármaco (46).

### 3.6.7. Efectos oculares y óticos

Casos de conjuntivitis, dolor ocular, glaucoma, pérdida de la acomodación ocular, hemorragia ocular, edema periorbitario, xeroftalmia, sordera, otalgia, ototoxicidad, y tinnitus se ha reportado tras administración de CTZ; sin embargo, no ha sido establecida una relación causal con el fármaco (46).

### 3.6.8. Porfiria

La base de datos para medicamentos relacionados a la Porfiria aguda de Suecia, Noruega y Reino Unido (NAPOS), clasifica el principio activo como no porfirrogénico; es decir, puede ser usado como fármaco de primera opción y ningún tipo de precaución es necesaria (56).

### 3.6.9. Efectos renales y genitourinarios

Cistitis, disuria, hematuria, poliuria, incontinencia urinaria, menorrea, o vaginitis son unos de los síntomas que han sido reportados tras ensayos clínicos con CTZ y placebo, sin que haya un estudio que indique una relación causal entre los síntomas y la administración de CTZ (46).

## 3.7. POBLACIÓN GERIÁTRICA

No existen estudios concluyentes en cuanto a la seguridad y eficacia de la CTZ en la población geriátrica. No obstante, se aconseja reducir la dosis y controlar la función renal de los pacientes debido a que esta población suele presentar la función renal disminuida en comparación con la población adulta (46).

## 3.8. MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD

No hay evidencias de mutagenicidad. En cuanto a carcinogenicidad, se han llevado a cabo estudios con ratones donde se les ha administrado dosis elevadas de CTZ durante dos años, administrándose en ratones machos una dosis equivalente a 15 y 7 veces la dosis máxima diaria recomendada a adultos o niños. Se observó un aumento en la incidencia de tumores benignos de hígado. Sin embargo, no se ha visto incidencia de tumores en ratones que recibieron dosis orales de CTZ de 4mg/kg al día (equivalente a dos veces la

dosis diaria máxima recomendada a adultos). Se desconoce la relevancia clínica de este hallazgo a largo plazo (46).

### 3.9. EMBARAZO, FERTILIDAD Y LACTANCIA

Pese a que estudios de reproducción con animales (ratones, ratas y conejos) no han detectado casos de teratogenicidad, no existen estudios controlados que avalen la seguridad en la administración de CTZ a mujeres embarazadas, con lo que el fármaco solo debe ser usado durante el embarazo cuando estrictamente necesario (46).

El uso de CTZ con pseudoefedrina ha demostrado aumentar el número de malformaciones fetales esqueléticas en estudios con ratas que ingirieron 5 veces la dosis máxima proporcional a humanos adultos. En estudios con conejos con dosis de aproximadamente 10 veces la dosis máxima proporcional a humanos adultos, no se han visto malformaciones fetales. No existen estudios controlados que avalen la seguridad en la administración de CTZ y pseudoefedrina a mujeres embarazadas, con lo que el fármaco solo debe ser usado durante el embarazo cuando estrictamente necesario (46).

En estudios con ratones tampoco se ha detectado infertilidad en dosis de CTZ 25 veces superiores al máximo diario recomendado a adultos, lo mismo ocurriendo con CTZ en combinación con pseudoefedrina (46).

CTZ se distribuye en la leche humana. Pseudoefedrina también se distribuye en la leche humana. Por lo tanto, no se recomienda el uso de CTZ sola o en combinación con clorhidrato de pseudoefedrina en mujeres lactantes (46).

### 3.10. TOXICIDAD AGUDA

La dosis letal aguda de CTZ en humanos es desconocida. La dosis letal mínima aguda en ratones es de 237 mg/kg (aproximadamente 95 o 40 veces la dosis oral máxima recomendada diariamente para adultos y niños, respectivamente, en base a mg/m<sup>2</sup>) y en ratas es de 562 mg/kg (aproximadamente 460 o 190 veces la dosis oral máxima recomendada para adultos y niños, respectivamente, en base a mg/m<sup>2</sup>).

En roedores, toxicidad aguda se refleja en el SNC, y la toxicidad de dosis múltiples en el hígado (46).

### 3.11. FARMACOCINÉTICA

No hay estudios que indiquen diferencias farmacocinéticas en cuanto a género y raza (46).

#### 3.11.1. Absorción

El fármaco es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal tras administración oral. La biodisponibilidad de los comprimidos convencionales es comparable a la de los comprimidos masticables y de la solución oral.

La administración de dosis entre 10 y 20 mg de CTZ (comprimidos o solución oral), en adultos sanos, ha alcanzado picos de concentración plasmática de 257-384 ó 580 ng/ml, respectivamente, tras 1 hora. Lo mismo ocurre con la administración de comprimidos masticables, que alcanzan picos de concentración plasmática tras 1 hora de administración.

La farmacocinética del fármaco es lineal para dosis entre 5-60 mg, con concentraciones plasmáticas que aumentan proporcionalmente al aumentar la dosis (46).

Picos medios de concentración plasmática de CTZ fueron de 356 ng/ml (con un rango de 292-420 ng/ml) y 357 ng/ml (con un rango de: 185-529 ng/ml) en pacientes con ligera (aclaramiento de creatinina de 42-77 ml/minuto) y moderada (aclaramiento de creatinina de 11-31 ml/minuto) insuficiencia renal, respectivamente.

El tiempo para alcanzar el pico de concentración plasmática en pacientes con insuficiencia renal moderada fue incrementado en 2,2 horas. Además, picos de concentración plasmática y ABC pueden aumentar en pacientes con insuficiencia hepática. En un estudio con pacientes con cirrosis biliar primaria que recibieron una dosis única por vía oral de 10 mg de CTZ, el pico de concentración plasmática medio de 498 ng/ml (con un rango de 380-616 ng/ml) ocurrió en aproximadamente 1 hora; CTZ fue aún detectada en algunos pacientes 96 horas después de la dosis (46).

Pese a que la alimentación puede disminuir el pico de concentración plasmática de CTZ (en 23, 37 ó 30% para comprimidos convencionales, comprimidos masticables o comprimidos de liberación prolongada en combinación con pseudoefedrina, respectivamente) y aumentar el tiempo de alcance del pico de concentración plasmática (de alrededor de 1,7; 2,8 ó 1,8 horas, respectivamente), la alimentación no afecta el grado de absorción (medido por el ABC) del fármaco (46).

Después de la administración oral de una dosis única de 10 mg de CTZ en adultos sanos, el efecto antihistamínico del fármaco (medido por la supresión de pápula y eritema inducidos por una inyección intradérmica de histamina) fue aparente entre 20 y 60 minutos en 50 y 95% de individuos, respectivamente, y persistió durante 24 horas. Además, seguido de administración oral de dosis única de 5 mg y 10 mg de CTZ en niños sanos (5-10 años de edad), el efecto antihistamínico del fármaco (medido por la supresión de pápula y eritema inducidos por inyección de histamina intradérmica) fue aparente entre 20-60 minutos y persistió durante 24 horas. En niños de 7-25 meses de edad que recibieron dosis oral de CTZ a una dosis de 0,25 mg/kg dos veces diarias por 4-9 días, 90% de inhibición de pápula inducida por la histamina y 87% de inhibición del eritema ocurrió 12 horas después de la administración de la última dosis. El efecto antihistamínico del fármaco puede persistir más tiempo en pacientes con insuficiencia hepática; datos limitados indican que la supresión de la pápula y del eritema persistió por 48 horas y 72 horas, respectivamente, en tales pacientes (46).

### 3.11.2. **Distribución**

La distribución de la CTZ y sus metabolitos en el organismo humano no ha sido totalmente elucidada. En animales, el fármaco parece ser extensivamente distribuido en muchos de los tejidos corporales y fluidos con concentraciones altas obtenidas en hígado, riñones y pulmones. Sin embargo, el volumen de distribución de la CTZ es relativamente bajo comparado al de otros antagonistas de receptores H<sub>1</sub>. El volumen de distribución es en torno a 0,39-0,6; 0,46; 0,54; 0,44; ó 0,38-0,56 l/kg en adultos sanos, pacientes con insuficiencia renal ligera (aclaramiento de creatinina de 42-77 ml/minuto), pacientes con insuficiencia renal moderada (aclaramiento de creatinina de 11-31 ml/minuto), pacientes con insuficiencia renal grave o pacientes geriátricos (edad media de 77 años), respectivamente (46).

La polaridad del fármaco aparentemente limita su distribución en el SNC. Estudios con animales indican que las concentraciones de CTZ en el cerebro se encuentran por debajo del 10% de las concentraciones encontradas en el plasma.

La CTZ se distribuye en la leche materna de humanos y animales. La CTZ se une a aproximadamente el 93% de las proteínas plasmáticas; la unión a proteínas plasmáticas

parece ser independiente de la concentración del fármaco (entre 25 -1000 ng/ml), lo que incluye las concentraciones plasmáticas habituales (46).

### 3.11.3. **Eliminación**

Tras la administración oral de una dosis única de 10 mg de CTZ en adultos sanos, el fármaco puede sufrir una eliminación bifásica, con una distribución inicial de semivida ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 3 horas y una eliminación media terminal de  $t_{1/2}$  de aproximadamente 8,3 horas (rango: 6,5-10 horas).

En pacientes pediátricos de 7-12 años, 2-5 años o 6-23 meses de edad, la  $t_{1/2}$  de eliminación del fármaco corregida según el peso fue de 33, 33-41 o 63% menos, respectivamente, que la observada en adultos. Además, la  $t_{1/2}$  de eliminación del fármaco en pacientes geriátricos (edad media de 77 años) recibiendo una dosis única de 10 mg por vía oral, se prolongó en cerca del 50% comparando con la de adultos jóvenes (edad media de 53 años) (46).

Pese a que una pequeña fracción de CTZ pasa por una *orto*-desalquilación oxidativa a un metabolito con una actividad antihistamínica insignificante, el fármaco se somete a un bajo grado de metabolismo de primer paso en el hígado. Dos metabolitos no identificados también se recuperaron en la orina; sin embargo, el sistema enzimático responsable de su metabolismo no ha sido identificado. Seguido de administración oral de una dosis única de 10 mg en individuos sanos, cerca del 80% de la dosis es excretada durante 5 días, mayoritariamente (más de un 50%) como fármaco inalterado; la mayor parte de la excreción ocurre en 24 horas.

En individuos sanos, cerca del 70 y 10% de una dosis radiomarcada fue recuperada en la orina y en las heces, respectivamente. La excreción fecal no ha sido bien caracterizada, y no se conoce que la excreción fecal del fármaco represente el fármaco no absorbido o si el fármaco es excretado por eliminación biliar.

En adultos sanos, el aclaramiento corporal total de CTZ informado fue de aproximadamente 53 ml/minuto, mientras que en niños de 7-12 años, 2-5 años de edad ó 6-24 meses de edad, el aclaramiento corporal aparente corregido por peso fue de 33, 81-111, ó 304% mayor, respectivamente, al observado en adultos.

El aclaramiento corporal total en adultos geriátricos (edad media de 77 años) recibiendo una dosis oral única de 10 mg de CTZ fue de 33-45% inferior que la de adultos jóvenes (edad media de 53 años). La disminución del aclaramiento corporal total en pacientes geriátricos puede estar relacionada con la disminución de la función renal en este grupo de edad.

Seguido de una administración oral de 10 mg de CTZ diarios durante 7 días, la eliminación del fármaco en pacientes con insuficiencia renal ligera (aclaramiento de creatinina de 42-77 ml/minuto) parece ser similar a la de adultos jóvenes sanos (aclaramiento de creatinina de 89-128 ml/minuto). Pacientes con insuficiencia renal moderada (aclaramiento de creatinina de 11-31 ml/minuto) recibiendo una dosis diaria durante 7 días y pacientes que tienen que hacer hemodiálisis recibiendo una dosis única de 10 mg presentan un triple aumento de la  $t_{1/2}$  y una disminución del 70% en el aclaramiento comparado con aquellos que son adultos jóvenes sanos. Menos del 10% de una dosis de 10 mg de CTZ se elimina por hemodiálisis. Pese a que el fármaco parece ser mínimamente metabolizado por las enzimas hepáticas, un 50-85% de aumento en la  $t_{1/2}$  y un 40-60% de disminución en el aclaramiento ocurren en pacientes con insuficiencia hepática crónica tras administración oral de una dosis única de 10 mg o 20 mg del fármaco (46).

## **PARTE EXPERIMENTAL**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la caracterización del principio activo, y para la ejecución del método analítico y estudios de formulación se ha utilizado el principio activo en polvo (cetirizina dihidrocloruro Ph. Eur) adquirido de Jubilant Lifesciences Ltd (Mysore, India).

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

#### 4.1.1. Metodología

##### 4.1.1.1. Resonancia Magnética Nuclear

La obtención del espectro  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN se ha efectuado en la Unidad de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona. Los datos han sido registrados por el equipo Varian Gemini-400 (100 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) con respecto al pico central del disolvente:  $\text{CDCl}_3$  d, 7,26 (H) o  $\text{DMSO-d}_6$  d, 2,49 (H) como patrones internos.

##### 4.1.1.2. Espectroscopía de Infrarrojo

La determinación del espectro por infrarrojo se ha efectuado en la Unidad de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona según el método general 2.2.24 de Ph. Eur. El equipo empleado es un FTIR Perkin Elmer modelo 1600. Se efectúa el ensayo con el fin de comprobar la pureza de la sustancia utilizada como principio activo, así como verificar su identidad mediante la obtención del espectro infrarrojo.

##### 4.1.1.3. Difracción por Rayos X

Se realiza el estudio del tipo de cristalización y diferenciación de polimorfos mediante análisis de difracción de rayos X por el método del polvo. Se introduce parte del material en polvo en capilares de vidrio Lindemann de 0,7 mm de diámetro. Se ha utilizado el equipo Difractómetro PANalytical X'Pert PRO MPD con goniómetro  $\theta/\theta$  de 240 mm de radio, configuración de haz convergente con espejo elíptico y geometría de transmisión con portamuestras para capilares con spinner, con las siguientes condiciones:

- Radiación  $\text{K}\alpha_1$  del Cu ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ).

- Potencia de trabajo: 45 kV – 40 mA.
- Ventanas en el eje incidente que determinan la altura del haz a 0,4 mm.
- Ventanas Soller de 0,02 radianes en el haz incidente y en el haz refractado.
- Detector PIXcel con longitud activa de 3,347 °.
- Barrido  $\theta/2\theta$  de 2 a 60 °  $2\theta$  con medida de paso de 0,026 ° y tiempo de medida de segundos por paso.

#### 4.1.1.4. Espectrofotometría UV-Vis

Para el barrido de longitud de onda UV-Vis, se ha utilizado el Espectrofotómetro SPECORD 205 UV-Vis. Se realiza un barrido con el espectrofotómetro UV-Vis de una disolución del principio activo con la finalidad de determinar su perfil espectrofotométrico y se definen los máximos de absorción existentes para la sustancia pura, que son característicos de dicha sustancia. Procedimiento:

Se prepara una solución de principio activo de 20 mg en 50 ml de una solución de 10,3 g/L de HCl diluido a 100 ml con el mismo ácido. Se diluye 10 ml de esta misma solución a 100 ml con una solución 10,3 g/L de HCl y se procede a su lectura. Se realiza el ensayo de Absorción indicado en la monografía del principio activo de la Ph. Eur. Se determina la máxima absorción a 230 nm, valor comprendido en el baremo indicado en la monografía del mismo (210 nm-350 nm).

#### 4.1.1.5. Estudio de solubilidad a pH 1,2; 4,5; 6,8; 7,0

Para el ensayo de solubilidad se preparan medios a pH 1,2; 4,5; 6,8 y 7,0, y se lleva a cabo el ensayo según procedimiento:

Agitar vigorosamente durante 1 minuto e introducir en un sistema a Ta constante ( $25 \pm 2$  °C) durante 15 minutos. Si la sustancia no se disuelve completamente, repetir la agitación un minuto más y colocar de nuevo el tubo en el sistema de Ta constante.

Método:

- Pesar 100 mg de principio activo, molido, en un tubo de ensayo con tapón (16 mm de diámetro y 160 mm de altura). Añadir 0,1 ml del disolvente o medio de disolución y proceder según procedimiento. Si la sustancia se disuelve

completamente, se define el principio activo como “muy soluble” en el medio empleado.

- Si la sustancia no se disuelve completamente, agregar 0,9 ml del disolvente o medio de disolución y proceder según procedimiento. Si la sustancia se disuelve, se describe como “fácilmente soluble”.
- Si la sustancia no se disuelve completamente, agregar 2 ml del disolvente o medio de disolución y operar nuevamente según procedimiento. Si la sustancia se disuelve, se describe como “soluble”.
- Si la sustancia no se disuelve completamente, agregar 7 ml del disolvente o medio de disolución, y operar según procedimiento. Si la sustancia se disuelve se describe como “poco soluble”.
- Si la sustancia no se disuelve completamente, pesar 10 mg del principio activo finamente pulverizado en un tubo con tapón, y agregar 10 ml del disolvente o del medio de disolución, y operar según procedimiento. Si la sustancia se disuelve, se define como “muy poco soluble”.
- Si la sustancia no se disuelve completamente, pesar 1 mg de sustancia finamente pulverizada en un tubo de ensayo con tapón, agregar 10 ml del disolvente o del medio de disolución y operar según “procedimiento”. Si la sustancia se disuelve, se describe como prácticamente insoluble.
- Para la elaboración de las soluciones reguladoras, se ha seguido criterio de Ph. Eur 8.7. para soluciones con pHs entre 1,2, 4,5, 6,8 y 7,0 (soluciones reguladoras fosfato).
- Para la preparación de las soluciones se ha utilizado los siguientes reactivos: HCl 37% (Panreac, Barcelona), NaCl (Panreac, Barcelona), NaOH (Panreac, Barcelona) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac, BCN). Tubos de ensayo. Todos los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

#### 4.1.1.6. Diagrama SeDeM

Para el diagrama SeDeM se utiliza para la caracterización de sustancias para conocer la viabilidad para la compresión (57-69). El perfil SeDeM informa sobre la mayor o menor

capacidad de una sustancia pulverulenta para ser comprimida mediante la tecnología de compresión directa. Además, también se aplica para orientar sobre cuál es la forma farmacéutica más idónea que precisa un principio activo para su posterior administración por vía oral, suministrando datos que llevarán a elegir las formas orales más comúnmente utilizadas. Los parámetros empleados son los siguientes:

Densidad aparente sin compactar, densidad aparente compactada, índice de esponjosidad, índice de Carr, índice de cohesividad, índice de Hausner, ángulo de reposo, capacidad de flujo, porcentaje de humedad relativa, porcentaje de higroscopicidad, porcentaje de partículas finas, índice de homogeneidad.

#### 3.1.1.5.1. Metodología aplicada a los ensayos SeDeM

- Densidad aparente sin compactar y compactada (Ph. Eur. 2.9.34).

El ensayo tiene por objetivo determinar, bajo condiciones definidas, los volúmenes aparentes antes y después de sedimentar, la capacidad de sedimentación y las densidades aparentes de sólidos divididos. Para ello se toman 100 g de muestra y se dispone en probeta, anotando el volumen aparente sin realizar ningún tipo de tratamiento y posteriormente se realizan 10, 500 y 1250 golpes utilizando voluminómetro automático SBS anotando los volúmenes aparentes obtenidos en las tres pruebas. En base a los datos primarios obtenidos, se calcula la densidad aparente no compactada y la compactada.

- Densidad aparente sin compactar

$$\delta_0 = m/V_0 \text{ (g/ml)}$$

Donde **m** es la cantidad de muestra pesada expresada en gramos y **V<sub>0</sub>** el volumen aparente sin compactar expresado en mililitros.

- Densidad aparente compactada

$$\delta = m/V_{1250} \text{ (g/ml)} \text{ ó } \delta = m/V_{2500} \text{ (g/ml)}$$

Donde **V<sub>1250</sub>** y **V<sub>2500</sub>** es el volumen aparente compactado a los 1250 y a los 2500 golpes.

- Índice de esponjosidad (Ie)

Se define como la porosidad intraparticular de la mezcla de polvos y se calcula, según la forma matemática:

$$I_e = D_c - D_a / D_c \times D_a$$

- Índice de Carr (Ph. Eur. 2.9.36)

Se define como la compresibilidad de una muestra pulverulenta o granulada. Se calcula según la siguiente fórmula matemática:

$$IC = (1 - D_a / D_c) \times 100$$

- Índice de Cohesividad (Icd)

Se determina comprimiendo directamente la muestra pulverulenta a estudiar, empleando la máquina de comprimir excéntrica. Se propone obtener cinco comprimidos de aproximadamente 1 g de peso final, en máquina excéntrica, con formato de 19 x 10 mm aplicando la máxima fuerza de compresión posible. Determinar peso y dureza (N) de los comprimidos obtenidos. Calcular la media de las durezas obtenidas. Ensayar inicialmente con el polvo sin ningún aditivo, pero si éste es abrasivo (imposibilidad de comprimir) se añade un 3,5% de la siguiente mezcla de lubricantes:

- Talco 2,36%
- Aerosil 200 0,14%
- Estearato magnésico 1,00%

- Índice de Hausner (Ph. Eur. 2.9. 36)

Permite conocer la facilidad de flujo de la muestra estudiada. Se calcula a partir de las medias obtenidas de las determinaciones de densidad aparente antes de sedimentar ( $D_a$ ) y densidad aparente compactada ( $D_c$ ):

$$IH = D_c / D_a$$

- Ángulo de reposo (Ph. Eur. 2.9.36)

La fluidez también se determina mediante el cálculo del ángulo de reposo que se realiza con un embudo ANORSA con referencia X5992. Se utiliza también una hoja de papel milimetrado.

Se coloca el embudo en una pinza de soporte metálico colocando en centro del papel milimetrado justo debajo de la boca inferior del embudo, a una distancia de 7 cm del

papel. Se tapa el embudo con un papel y se enrasa con la muestra, haciendo pasar la espátula por los lados de éste. Seguidamente se retira de forma rápida el papel y el polvo va cayendo sobre el papel milimetrado (si esto no ocurre, golpear suavemente el embudo con la espátula metálica hasta que deslice todo el polvo).

Leer los cuatro radios del cono formado en la hoja y medir la altura del cono con la parte inferior del pie de rey. A partir de aquí calcular el ángulo de reposo sabiendo que:

$$A = (\text{antigt } H/ r)$$

Siendo:

H la altura del cono

r la media de los cuatro rayos

- Capacidad de flujo o velocidad de deslizamiento (Ph. Eur. 2.9.16)

En este apartado se mide el tiempo que tarda en caer todo el polvo que se dispone en un embudo adecuado dando así la medida del deslizamiento. El material necesario para la realización de este ensayo es el siguiente:

Embudo ANORSA con referencia X7705, soporte metálico con nuez, pinza y cronómetro.

Para realizar este ensayo se pesan 100 g de la muestra a examinar, se tapa la boca del embudo con un papel y se llena el embudo con la muestra. A continuación se retira el papel que tapa la boca del embudo y se anota el tiempo que tarde en deslizar toda la muestra medida con un cronómetro. La determinación de la velocidad de deslizamiento se realiza por triplicado. La capacidad de flujo se expresa en segundos y décimas de segundos con relación a 100 g de muestra. Si la muestra no llega a caer completamente, se expresa como tiempo infinito.

- Humedad relativa (%HR)

Se determina aplicando el ensayo de pérdida por desecación según monografía Ph. Eur. 2.2.32. Efectuar desecación en estufa a  $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , hasta peso constante.

- Higroscopicidad (%H)

Se determina el aumento de peso de la muestra mantenida en humectador en un ambiente de 76% ( $\pm 2$  %) de humedad relativa y temperatura de  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

- Determinación del porcentaje de partículas  $< 50\text{ }\mu\text{m}$  (%Pf)

Aplicando el método general de la monografía Ph. Eur 2.9.12 para la determinación del tamaño de partículas por tamización, determinar el % de partículas que pasan por el tamiz de 0,05 mm de luz, sometido a vibración durante 10 minutos en posición 10 (vibrador CISA).

- Índice de homogeneidad (I $\theta$ )

Aplicando el método general de la monografía Ph. Eur. 2.9.12., para la determinación del tamaño de partículas por tamización, se determina la granulometría de 100 gramos de muestra, sometiendo la cascada de tamices a vibración durante 10 minutos en posición 10 (vibrador CISA). Tamices empleados: 0,355- 0,212 – 0,100 – 0,05 mm de luz. Calcular el % de producto retenido en cada tamiz y la cantidad que pasa a través del tamiz de 0,05 mm de luz. Previamente, se determina el % de partículas finas ( $< 50\text{ }\mu\text{m}$ ) en operación aparte. Debe tenerse en cuenta que si esta fracción es muy elevada, al determinar la granulometría con varios tamices, cabe la posibilidad de que parte de las partículas queden adheridas al producto retenido en el resto de tamices, obteniéndose un resultado inferior al real en la fracción  $< 50\text{ }\mu\text{m}$ .

A partir de los datos obtenidos, se aplica la siguiente ecuación:

$$*I\theta = F_m/100 + (d_m - d_{m-1})F_{m-1} + (d_{m+1} - d_m)F_{m+1} + (d_m - d_{m-2})F_{m-2} + (d_{m+2} - d_m)F_{m+2} + \dots + (d_m - d_{m-n})F_{m-n} + (d_{m+n} - d_m)F_{m+n}$$

Siendo:

I $\theta$ : Índice de homogeneidad relativa. Homogeneidad del tamaño de partículas en el intervalo de las fracciones consideradas.

F $_m$ : Tanto por ciento de partículas comprendidas en el intervalo mayoritario.

F $_{m-1}$ : Tanto por ciento de partículas comprendidas en el intervalo inmediato inferior al mayoritario.

F $_{m+1}$ : Tanto por ciento de partículas comprendidas en el intervalo inmediato superior al mayoritario.

n: N° de orden de la fracción considerada dentro de una serie con respecto a la mayoritaria.

dm : Diámetro medio de las partículas de la fracción mayoritaria.

dm-1: Diámetro medio de las partículas de la fracción del intervalo inmediato inferior al mayoritario.

dm+1: Diámetro medio de las partículas de la fracción del intervalo inmediato superior al mayoritario.

## 4.2. MÉTODO ANALÍTICO

### 4.2.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Todas las soluciones se han preparado con agua Milli-Q desionizada proveniente de un purificador de agua MilliQ gradient A10 (Molsheim, Francia). Acetonitrilo de grado CLAE se obtuvo de Panreac (Barcelona, España). Ácido orto-fosfórico 85 % se ha comprado de Panreac (Barcelona, España) Fosfato potásico dibase Ph. Eur. ( $K_2HPO_4$ ) se ha comprado de Fagron (Terrassa, España). Ácido clorhídrico al 37 %, hidróxido sódico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 33% se han adquirido de Panreac (Barcelona, España).

### 4.2.2. Equipos y condiciones cromatográficas

Las muestras se han analizado con el CLAE Dionex Ultimate 3000 HPLC Thermo Fisher Scientific (California, EEUU), equipado con base de datos Chromeleon versión 6.8 SP2 Build 2284, con desgasificador SR3000, bomba cuaternaria LPG-3400, inyector WPS3000, horno 6P TCC-3100, detector UV-Vis PDA-3000. Para los estudios iniciales de desarrollo se ha utilizado una columna cromatográfica Kromasyl 100-5C18 150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m tamaño de partícula (Tecnokroma Akzonobel, Terrasa, España). Para los estudios finales de desarrollo y validación del método, se ha utilizado una columna cromatográfica Eclipse XDB-C8 150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m tamaño de partícula (Agilent columns, Barcelona, España). Una fase móvil isocrática consistiendo de acetonitrilo y de solución reguladora al 0,2 M de fosfato potásico dibase Ph. Eur. a pH 7 (35:65 v/v) se ha utilizado, y el análisis se ha llevado a cabo con un flujo de 1 ml  $min^{-1}$ . Todas las determinaciones se han llevado a cabo a 30 °C. El volumen de inyección fue de 25  $\mu$ L. El detector fue puesto a  $\lambda$  230 nm. La homogeneidad de pico fue expresada en términos de factor de pureza de pico y se ha obtenido directamente del análisis espectral usando el

software antes mencionado. Otros aparatos incluyen el pHmetro Crison micropH 2002 pH meter (Barcelona, España) y el horno Heraeus T5028 (Hanaus, Alemania) para degradación térmica -calor seco a 105 °C.

#### 4.2.3. **Estudios de degradación y preparación de las muestras**

Los estudios de degradación se han llevado a cabo mediante preparación de soluciones estándar de CTZ a 500 µg ml<sup>-1</sup>, para cada estudio de degradación. Cada muestra ha sido analizada de acuerdo a procedimientos previamente descritos abajo. A seguir se describe el procedimiento de preparación de las muestras:

- a) Hidrólisis ácida y básica: 5 mg de polvo de principio activo se ha tratado con 5 ml de 0,1 M de HCl y 0,1 M de NaOH. Los viales se han ubicado en horno de calor seco a 105 °C. Otros 5 mg de polvo de principio active se ha tratado con 5 ml de 0,1 M de HCl and 0,1 M NaOH a temperatura ambiente, por 24 horas.
- b) Oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 33%: 5 mg de polvo de principio activo han sido expuestos a 5 ml de peróxido de hidrógeno a 33% (p/v). El vial se ha mantenido a temperatura ambiente por 24 horas.
- c) Luz Infrarrojo (IR) y ultravioleta (UV): una muestra de 5 mg de polvo de principio activo ha sido expuesta a luz infrarroja y otra muestra de 5 mg de principio activo ha sido expuesta a luz ultravioleta durante 24 horas.
- d) Humedad HR79%: una muestra de 5 mg de polvo de principio activo se ha puesto dentro de un humidificador con HR79 % durante 24 horas.
- e) Calor seco a 105 °C: una muestra de 5 mg de polvo de principio activo se ha colocado dentro de un horno de calor seco a 105 °C durante 24 horas.
- f) Luz ambiente durante 15 días: una muestra de 5 mg de principio active se ha colocado dentro de un vial que se ha dejado expuesto a luz natural directa y a temperatura ambiente durante 15 días.

Una vez completadas las condiciones de degradación, 10 ml de solución reguladora fosfato 0,2 M (pH 7) se ha añadido a las muestras de manera a conseguir la solución estándar de concentración 500 µg ml<sup>-1</sup>. Además, todas las soluciones y blancos han sido filtrados con un filtro PVDF 0,45 µm mediante jeringa. Los resultados han sido

recopilados en términos de tiempos de retención relativos ( $t_{R}$ ) encontrados durante el análisis por CLAE.

#### 4.2.4. **Validación del método analítico**

Para validar el método CLAE- FR desarrollado, se siguen las recomendaciones de la ICHQ2B para validación de método analítico, en términos de selectividad, linealidad, rango, exactitud, precisión, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) (70). De forma a cumplir con las especificaciones de ICH en términos de linealidad y rango para el método analítico (uniformidad de contenido y ensayo de principio activo y producto acabado), se ha estudiado un rango lineal de entre 70-130%, mediante análisis de una serie de tres replicados, es decir, tres series independientes ( $k = 3$ ), cada una con siete concentraciones diferentes ( $n = 6$ ):  $350 \mu\text{g ml}^{-1}$  -  $650 \mu\text{g ml}^{-1}$ , considerando la concentración de  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  como 100% (solución estándar), para recabar información sobre la variación en el área del pico entre muestras de una misma concentración. Para la evaluación de las estimativas de precisión, reproducibilidad y precisión intermedia se han llevado a cabo ensayos a tres niveles de concentración (650, 500 and  $350 \mu\text{g ml}^{-1}$ , correspondiendo a 130, 100 and 70%), y a 10 inyecciones para cada muestra and 10 ( $k = 10$ ), por día.

Promedio, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV %) del  $t_R$  y el área de pico alcanzada individualmente en día 1 y 2 han sido calculados. Tras el análisis de CLAE, el factor respuesta (RF) ha sido calculado entre la respuesta (Y) y la concentración alcanzada (X), como  $Y/X$ . Siendo así, el promedio, SD y CV% han sido calculados usando los factores respuesta obtenidos mediante hoja de cálculo Excel 2007. Los resultados de factor respuesta deben cumplir con un  $CV \pm 2\%$ . Para exactitud, la concentración encontrada expresada como la función de la repetitividad de la solución estándar, error relativo % y porcentaje de recuperación, con un promedio, SD y CV % de cada una de las tres concentraciones estudiadas (650, 500 and  $350 \mu\text{g ml}^{-1}$ , han sido consideradas como tres replicados) han sido calculadas. Para el principio activo se ha considerado aceptable una recuperación de entre el 98-102% (71).

Para la determinación y cuantificación de los productos de degradación, linealidad, precisión, exactitud, y LOD and LOQ han sido calculados. Para llevar a cabo la validación, diluciones seriadas de una solución madre  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  con la fase móvil

especificada se han llevado a cabo de manera a obtenerse las correspondientes concentraciones:  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $1,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $0,125 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Un total de siete rectas de calibración independientes (siete replicados,  $k = 7$ ) han sido preparadas. Los LOD y LOQ han sido calculados con la relación entre la SD de los puntos de intersección con el eje de las “y” de siete rectas de calibración mencionadas anteriormente mediante promedio de las pendientes de las rectas de calibración multiplicado por 3,3 y 10, respectivamente (60, 61). Se ha analizado cada dilución seriada ( $k = 7$ ) con seis niveles de concentración ( $n = 6$ ).

En términos de error relativo y porcentaje de recuperación: tres concentraciones ( $5$ ,  $1,25$  y  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de productos de degradación han sido evaluados. Todas las soluciones preparadas han sido filtradas con un disco de filtración de PVDF de  $0,45 \mu\text{m}$  a viales para inyección en sistema CLAE.

### 4.3. ESTUDIOS DE PREFORMULACIÓN Y FORMULACIÓN

#### 4.3.1. Materiales

CTZ cedida por Reig Jofre Group. Excipientes: Manitol (agente de carga crioprotector) y polivinil pirrolidona calidad Ph. Eur (aglutinante), glicirricinato amónico, sucralosa, esencia de menta piperita Ph. Eur. Agua destilada. Todos los excipientes son de Fagron S.A (Terrassa, España).

#### 4.3.2. Equipos

Liofilizador Telstar® L-3 (Telstar, Terrassa, Spain). Bandejas de acero inoxidable. Las soluciones se han dosificado en moldes de policloruro de vinilo (PVC) y dosificados con pipeta automática Multipette Plus Eppendorf (Hamburg, Germany). Envasadora al vacío Food Saver para el envasado de los blisters con liofilizados orales.

#### 4.3.3. Ciclo de liofilización

El ciclo estándar de liofilización consiste en un periodo de congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$ , con sublimación aplicando presiones entre  $95\text{-}125 \mu\text{Bar}$  y secado secundario (desorción) a  $40^{\circ}\text{C}$ . Las bandejas de acero inoxidable con los moldes de PVC dosificados depositan en la cámara de liofilización para la congelación previa del producto. El tiempo mínimo de congelación es de 2 horas. El ciclo de liofilización (secado primario y secundario) tiene un periodo aproximado de 24-28 horas en total. Tras el ciclo de liofilización, los moldes

de PVC con liofilizados orales se envasan al vacío en bolsas de polietileno mediante la envasadora Food Saver y se almacenan en desecadores con sílice gel.

#### 4.4. TÉCNICAS PARA DISEÑO FACTORIAL 3<sup>2</sup>

##### 4.4.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g'$ ) de soluciones de principio activo, excipientes manitol y PVP K30 y las soluciones estudiadas, se ha efectuado mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se prepararon muestras líquidas de CTZ al 2% en agua purificada (p/v), manitol, PVP K30, y combinaciones entre ellos, que se han depositado en un recipiente sellado sin posibilidad de aplicación de vacío. Las muestras primeramente se congelan para luego calentarse progresivamente. Se han analizado las muestras de las soluciones A, B, D, C, E, F, G, H e I utilizando el equipo DSC 821e Mettler Toledo (Toledo, EEUU), con software STARe SW 9.30 DSC, mediante el siguiente ciclo:

- 25 °C a - 80 °C (- 10°C/min)
- -80 °C 1.0 min
- -80 °C a 25 °C (10 °C/ min)

Para determinación de  $T_g'$  de las muestras de soluciones E1, E2, y E3, el mismo equipo y software se ha utilizado, con reducción de la temperatura mínima hasta -60 °C, mediante el siguiente ciclo:

- 25 °C a - 60 °C (- 10 °C/min)
- -60 °C 1,0 min
- -60 °C a 25 °C (10 °C/ min)

#### 4.4.2. Microscopía de liofilización (FDM, Freeze drying microscopy)

La técnica de microscopía de liofilización (freeze-drying microscopy, FDM en inglés) se ha llevado a cabo en el centro de Excelencia de Liofilización (Sant Joan Despí, Reig Jofré Group), mediante equipo Olympus, modelo BX51, 10x (objetivo). Bomba de nitrógeno líquido para congelar las soluciones estudiadas: LNP94-2, Linkam Scientific Instruments Ltd.

La técnica se ha utilizado para la determinación de la temperatura de colapso ( $T_c$ ) de las soluciones A, B, C, D, E, F, G, H e I (combinaciones entre principio activo y distintas concentraciones de los excipientes manitol y povidona K30). Una pequeña gota de cada solución se deposita en una lámina de cristal, mientras que una segunda lámina de cristal se coloca encima de la gota. La cámara de sella y se congela la muestra mediante nitrógeno líquido. Tras congelar la muestra, se aplica vacío y se aporta calor para sublimar la muestra, la cual puede visualizarse al microscopio. Las sustancias secas presentan un aspecto oscuro. Mediante uso de una cámara digital se obtienen imágenes cada dos segundos. Una vez se alcanza la temperatura de colapso, la capa seca que está más cercana a la interfase de sublimación empieza a generar puntos brillantes que indica pérdida de estructura (colapso). Al aumentar la temperatura aplicada a la muestra se puede observar más pérdida de estructura. La técnica FDM se puede comparar con la técnica DSC, siendo que en la última la muestra líquida se encuentra dentro de un recipiente sellado sin posibilidad de aplicación de vacío.

Cada muestra ha sido analizada por duplicado.

Método aplicado:

<b>Tasa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Holding time</b>
10 °C/min	TA a -60 °C	3 min (inicio vacío)
10 °C/min	60 °C a -40° C	0 min
5 °C/min	-40 °C a 20 °C	0 min

#### 4.5. CARACTERIZACIÓN DEL LIOFILIZADO ORAL

##### 4.5.1. Viscosidad de las soluciones E1, E2 y E3

El análisis del comportamiento reológico de las muestras E1, E2 y E3 se ha llevado a cabo mediante equipo Reómetro rotacional Haake™ Reostress™ 1. Para el tratamiento de los datos de flujo y viscosidad se utiliza el software RheoWin Job Manager 2.97 y Rheo WinData Manager. Las formulaciones han sido analizadas según la velocidad de cizalla aplicada ( $s^{-1}$ ) y la tensión de cizalla (Pa), obteniéndose la viscosidad dinámica en Pa. s. El análisis empieza con una velocidad de cizalla creciente de 0 a  $100 s^{-1}$  durante 1 minuto, se mantiene a  $100 s^{-1}$  durante 1 minuto y luego se reduce la velocidad de  $100 s^{-1}$  a  $0 s^{-1}$ , durante 1 minuto. De este modo se obtienen las rectas de flujo de las cuales se puede determinar la viscosidad aparente de las muestras a  $100 s^{-1}$ . Cada muestra se ha analizado por duplicado, a una temperatura controlada de  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Las mediciones se han realizado con las muestras preparadas un día antes.

##### 4.5.2. Controles en proceso: pH y densidad

Densidad absoluta y pH han sido los dos controles en proceso establecidos para las formulaciones estudiadas antes del proceso de liofilización.

Para la determinación del pH se ha utilizado el equipo Crison micropH 2002 pHmeter (Barcelona, España). Para la determinación de la densidad absoluta se ha utilizado el densímetro Anton Para DMA (Graz, Austria).

##### 4.5.3. Fracturabilidad del liofilizado oral

El ensayo de fracturabilidad es indicativo de resistencia mecánica. Se ha analizado la resistencia mecánica de muestras liofilizadas E1, E2 y E3 previamente almacenadas en moldes de PVC, selladas al vacío y mantenidas protegidas de la humedad en desecador, antes de cada ensayo. Se ha llevado a cabo con el texturómetro Stable Micro Systems™ (5 kg) con células de carga intercambiables. Se han analizado 20 muestras de cada uno de los liofilizados orales E1, E2 y E3. 10 unidades se analizaron mediante aplicación de fuerza a 1 mm de compresión (cN) a la cara convexa superior del liofilizado oral y 1 mm de compresión (cN) a la cara cóncava de 10 unidades.

#### 4.5.4. **Tiempo de disgregación del liofilizado oral**

La determinación del tiempo de disgregación de los liofilizados orales se ha llevado a cabo mediante técnica establecida en Ph. Eur.

Procedimiento: Se deposita un liofilizado oral en un vaso de precipitados que contenga previamente 200 ml de agua destilada a una temperatura de entre 15 – 25 °C. Debe disgregarse en máximo 3 minutos. El ensayo debe efectuarse seis veces. El ensayo se considera conforme cuando las seis muestras logran deshacerse antes del tiempo de disgregación establecido.

#### 4.5.5. **Ensayo de humedad residual mediante técnica Karl Fischer volumétrica**

El ensayo de humedad residual para los liofilizados orales ha sido llevado a cabo mediante técnica de Karl Fischer (titración volumétrica) con equipo 890 Titrand con Touch Control Metro HM (Herisau, Suiza). El resultado se obtiene en % de humedad.

El equipo una vez encendido, necesita un periodo de equilibrio de entre 15 a 30 minutos. Antes de cada análisis, se pesa cada muestra de liofilizado oral mediante balanza analítica Sartorius ME235P, en mg. Una vez pesadas las muestras, en el equipo Karl Fischer se introduce el peso en mg de cada muestra antes de cada titración volumétrica.

#### 4.5.6. **Microscopia electrónica de barrido (SEM)**

Se ha analizado la fracción interna de muestras de los liofilizados orales E1, E2 y E3 mediante uso del equipo SEM en los servicios científicotécnicos de la UB. Para ello se ha cortado longitudinalmente una muestra de cada liofilizado oral (E1, E2 y E3) con una lámina de metal. Tras el corte, se ha añadido polvo de oro a la superficie de la muestra cortada. Las muestras han sido analizadas mediante microscopio Electrónico de Barrido Quanta 200 (FEI, Co.), con un voltaje de aceleración del haz de electrones 10.00 kV.

#### 4.6. **ESTUDIO DE ESTABILIDAD: ANÁLISIS DVS-TGA**

El estudio se llevó a cabo mediante técnica de termogravimetría de sorción (DVS-TGA) con el equipo Q5000SA (TA Instruments). El método DVS permite verificar el cambio en la masa de una muestra (en polvo) en función de la humedad relativa y el tiempo. Las muestras han sido pequeñas fracciones de cada una de las muestras de liofilizados orales E1, E2 y E3, que han sido analizadas con un ciclo de 6000 minutos máximo, manteniendo

condiciones de Humedad Relativa (HR%) y temperatura previamente estipuladas. Primeramente se han ensayado con condiciones extremas de humedad relativa y temperatura (40 °C de temperatura y humedad relativa de 45 a 95%). Tras el primer ensayo, se ha vuelto a analizar las muestras con condiciones menos extremas (25 °C y a una humedad relativa máxima de 60 %).

## **RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

La caracterización del principio activo no solo busca identificarlo en cuanto a su estructura química y pureza, como ayuda a reconocer posibles dificultades que el mismo pueda presentar en el desarrollo de la formulación deseada.

En la caracterización de la CTZ no se ha podido llevar a cabo con éxito la determinación del tamaño de partícula mediante técnica de difracción de rayos láser (las partículas se aglutinaban en los medios utilizados, indicando valores no reproducibles).

#### 5.1.1. Resonancia Magnética Nuclear

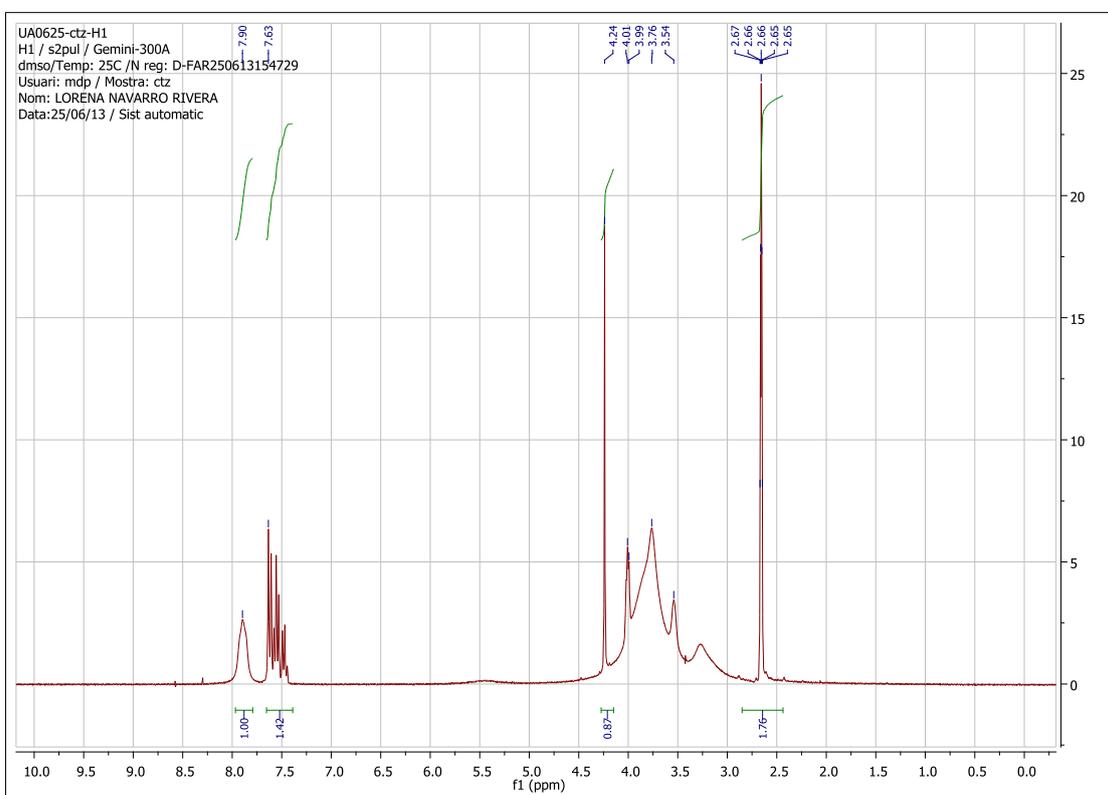


Fig 6. Espectro RMN obtenido según determinación en la unidad de Química farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Se confirma la presencia de CH<sub>2</sub>-N (del anillo piperazínico), del grupo funcional Ar (arilo), del grupo carboxilo -COOH, y demás grupos (CH<sub>2</sub>-O) que componen la molécula de CTZ.

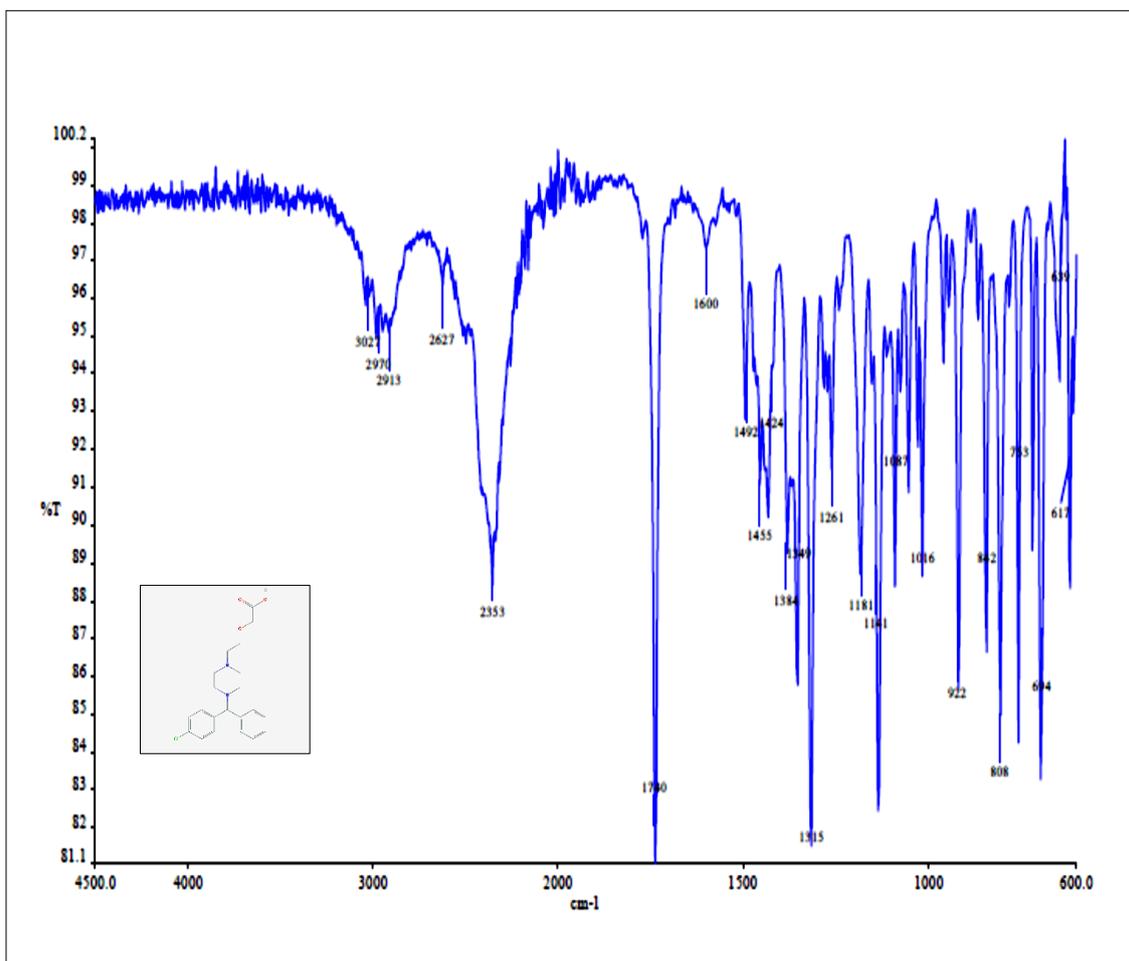


Fig 7. Espectro infrarrojo obtenido en la unidad de Química Farmacéutica.

### 5.1.2. Espectroscopía de Infrarrojo

La Fig. 7 indica picos de absorción que identifican el principio activo puro. El espectro IR enseña que alrededor de  $3500\text{ cm}^{-1}$  se puede verificar picos de absorción identificativos de grupo hidroxilo (-OH), que hace parte del grupo  $-\text{COOH}$  característico de ácido carboxílico, un pico de absorción en  $2627\text{ cm}^{-1}$  la presencia de  $-\text{COO}^-$ , un pico de absorción en  $1740\text{ cm}^{-1}$  característico de  $-\text{C}=\text{O}$  del grupo funcional carboxilo, alrededor de  $1500\text{ cm}^{-1}$  diferentes picos de absorción que indican grupos  $-\text{CH}$ , presentes en la cadena alifática de la molécula; un pico de absorción a  $1315\text{ cm}^{-1}$  correspondiendo a  $-\text{C}-\text{N}$  (indicativo del anillo piperazínico), alrededor de  $1000\text{ cm}^{-1}$  un pico identificativo de  $-\text{C}-\text{O}$  y en  $612\text{ cm}^{-1}$  un pico que corresponde a la unión entre  $-\text{C}-\text{Cl}$ .

### 5.1.3. Difracción de Rayos X

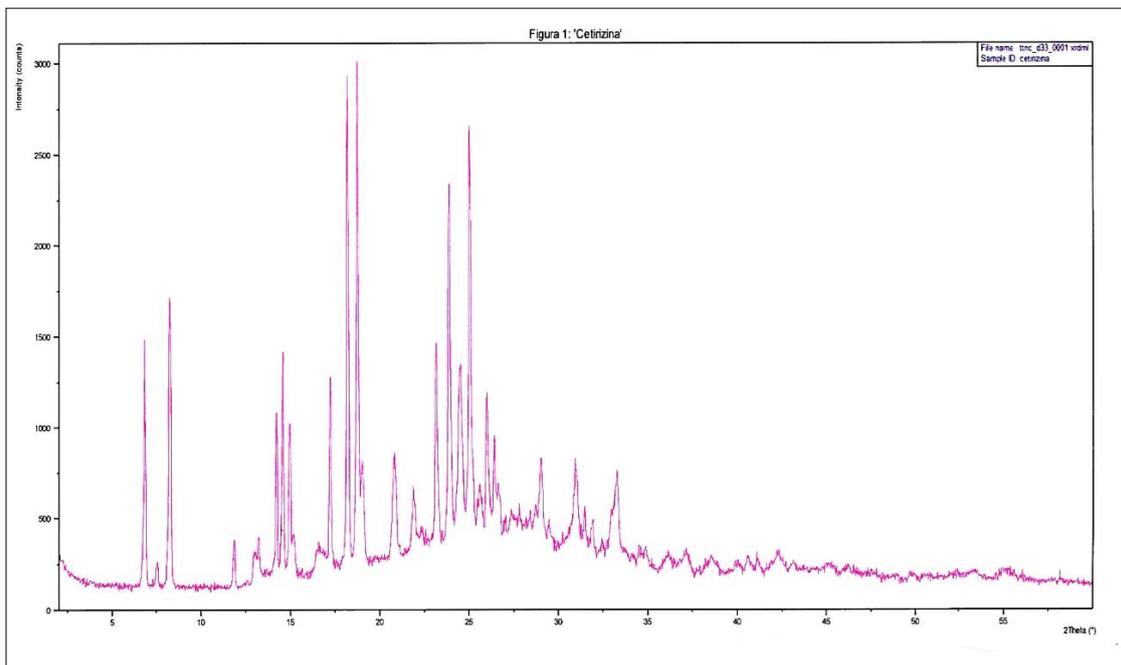


Fig. 8. Difracción de RX de cetirizina dihidrocloruro obtenido en los Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona.

El difractograma del principio activo puro enseña numerosas líneas de alta intensidad lo que indica que la muestra analizada se encuentra en estado cristalino. La figura representa el diagrama de difracción del principio activo, obtenido en el rango angular principal de 2 a 60 °2θ. La tabla en pdf (**Fig 10**) relaciona los picos observados en el mismo rango angular.

Pos. [ $^{\circ}2\theta$ ]	Height [cts]	FWHM [ $^{\circ}2\theta$ ]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
6,8640	1313,93	0,1023	12,87810	48,87
7,5458	123,02	0,1023	11,71605	4,58
8,2784	1541,12	0,1535	10,68083	57,32
11,8731	254,51	0,1023	7,45390	9,47
12,9815	144,61	0,1535	6,81988	5,38
13,2331	234,35	0,1023	6,69074	8,72
14,2277	905,93	0,1023	6,22521	33,70
14,5830	1212,01	0,1023	6,07430	45,08
14,9672	841,16	0,0768	5,91926	31,29
15,2127	221,01	0,1279	5,82426	8,22
16,5259	116,56	0,2558	5,36428	4,34
17,2427	1031,34	0,1023	5,14288	38,36
18,2035	2626,99	0,1023	4,87354	97,71
18,7627	2688,50	0,1279	4,72954	100,00
19,0610	517,50	0,1279	4,65619	19,25
20,8733	483,74	0,1791	4,25584	17,99
21,8775	304,29	0,1791	4,06270	11,32
23,1649	1082,48	0,1279	3,83975	40,26
23,8953	1889,02	0,1535	3,72401	70,26
24,5301	917,47	0,2047	3,62906	34,13
25,0539	2219,85	0,1279	3,55436	82,57
25,6100	255,49	0,1279	3,47843	9,50
26,0093	757,90	0,1279	3,42593	28,19
26,4337	514,71	0,1023	3,37188	19,14
26,6570	250,52	0,1535	3,34414	9,32
27,3669	114,66	0,1535	3,25898	4,26
27,8055	143,88	0,0768	3,20856	5,35
28,7477	178,27	0,1535	3,10552	6,63
29,0430	422,50	0,1535	3,07460	15,72
29,4924	104,62	0,1535	3,02877	3,89
30,9786	479,33	0,1279	2,88677	17,83
31,4989	219,80	0,1023	2,84027	8,18
31,9475	167,28	0,1023	2,80140	6,22
33,3274	398,32	0,1535	2,68850	14,82
34,5586	82,78	0,1535	2,59548	3,08
34,9292	91,15	0,1535	2,56879	3,39
36,1073	88,29	0,2047	2,48764	3,28
37,1157	100,74	0,3070	2,42234	3,75
38,6010	71,92	0,5117	2,33248	2,68
40,6312	72,43	0,1535	2,22050	2,69
41,1660	48,53	0,1535	2,19288	1,80
42,2811	86,63	0,2558	2,13759	3,22
43,1523	40,31	0,3070	2,09643	1,50
45,1969	43,76	0,4093	2,00624	1,63
46,1428	34,42	0,3070	1,96729	1,28
49,8362	21,91	0,3070	1,82980	0,81
53,3268	33,14	0,6140	1,71797	1,23
55,0446	42,12	0,6240	1,66698	1,57

Fig 9. Listado de picos observados en el diagrama de difracción de rayos X del principio activo.

#### 5.1.4. Espectrofotometría UV-Vis

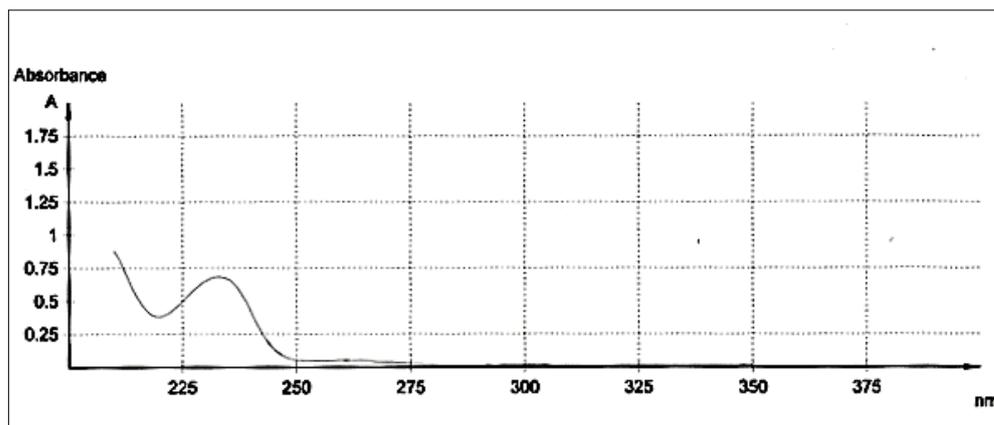


Fig. 10. Perfil espectrofotométrico del principio activo donde se definen los máximos de absorción existentes para la sustancia pura.

Se confirma la longitud de onda ( $\lambda$ ) en ensayo de espectrofotometría UV-Vis mediante barrido para determinar el perfil espectrofotométrico, donde se definen los máximos de absorción existentes para la sustancia pura. La longitud de onda máxima se encuentra a 231 nm, cumpliendo con la especificación de Ph. Eur. para cetirizina dihidrocloruro.

#### 5.1.5. Estudio de solubilidad para pH 1,2; 4,5; 6, 8 y 7,0

Hemos estudiado la solubilidad del principio activo en 4 pHs (1,2; 6,8; 7,0; y 4,5). Los estudios de solubilidad demostraron que el principio activo es muy soluble a pH 6,8 y 7,0, mientras que es muy poco soluble a pH 1,2 y 4,5 (el principio activo es libremente soluble en disuelto en agua destilada, presentando un carácter ácido, con un pH de entre 1,2 -1,8).

### 5.1.6. Diagrama SeDeM

Tras análisis del principio activo mediante diagrama SeDeM, se obtienen los siguientes resultados (ver Fig. 11):

CTZ presenta unos resultados bajos en lo que se refiere a los parámetros relativos a las dimensiones de la forma farmacéutica en que podría ser formado. En efecto, su densidad aparente sin compactar es de 0,207 g/ml mientras que su densidad aparente después de compactar es de 0,276 g/ml. Ello demuestra que se está ante una sustancia con muy baja densidad, lo cual dificultará la obtención de formas farmacéuticas sólidas de administración oral, ya que con una pequeña cantidad de fármaco ocupa un gran volumen. Este hecho implica la necesidad de diseñar una adecuada formulación para conseguir obtener el medicamento deseado. En cuanto a los parámetros relativos a la compresibilidad, a pesar de tener una media suficiente ( $r = 5,00$ ), debe matizarse este resultado en función de los parámetros estudiados. En efecto, de los tres parámetros considerados, el único con un valor excelente ( $r = 10$ ) es el índice de esponjosidad, que proviene del cálculo matemático realizado a partir de los valores dimensionales de las densidades; como estos valores son muy próximos entre ellos, el índice de esponjosidad es excelente, ya que refleja una mínima variabilidad entre densidades aparente sin compactar y compactada, reflejo de existir poco aire incorporado entre las partículas sólidas, lo cual es positivo con respecto a un proceso de compresión. Sin embargo, el índice de Carr es simplemente suficiente y el parámetro índice de cohesividad es muy deficiente ( $r = 0$ ), hasta el punto de ser nulo. Este hecho implica una seria dificultad para su compresión, sobre todo por vía directa, lo cual hace desaconsejable la obtención de un comprimido bucodispersable, debiéndose plantear como alternativa la obtención de un liofilizado oral.

Los parámetros correspondientes al deslizamiento y fluidez del fármaco son también deficientes, teniendo unos valores de radio nulos ( $r = 0$ ) en los parámetros ángulo de reposo y tiempo de deslizamiento. Se demuestra, de esta manera, que el dihidrocloruro de cetirizina presenta unas muy malas características reológicas que harán difícil su empleo en la elaboración de formas farmacéuticas sólidas de administración oral, debiendo ser aconsejable la fabricación de un liofilizado oral, por cuanto las características reológicas no influyen en la elaboración. En efecto, al tenerse que preparar

una disolución acuosa para poder aplicar al proceso de liofilización, la reología de la sustancia pulverulenta pierde toda influencia en el proceso tecnológico de elaboración y, en consecuencia, en la obtención del medicamento y su calidad intrínseca.

Los parámetros relativos a la humedad e higroscopicidad del fármaco son excelentes, presentando un contenido de humedad bajo (0,150%) y una higroscopicidad espontánea también baja (0,200%). Estos factores denotan que el dihidrocloruro de cetirizina presentará un comportamiento de estabilidad adecuado en forma sólida, lo que es bueno para la obtención final de formas farmacéuticas sólidas de administración oral. También es positivo este comportamiento con respecto a la estabilidad final del liofilizado oral, por cuanto minimizará la tendencia a captar humedad que todo liofilizado tiene.

Finalmente, el fármaco estudiado presenta una cantidad de partículas inferiores a  $0,50\ \mu\text{m}$  adecuada para su fácil manipulación en estado sólido, si bien su distribución granulométrica es demasiado amplia. Todo ello no presenta influencia en la obtención de un liofilizado, por cuanto no influirá en su correcta dispersión en el medio acuoso que debe efectuarse previa a la liofilización ya que se trata de una sal soluble en agua.

De todo ello, resulta que se obtienen unos índices paramétricos insuficientes ( $IP = 0,42$ ;  $PP = 5,00$ ;  $IGC = 4,79$ ) para el planteamiento sencillo de fabricación por compresión directa, que son los obligados para la obtención de un comprimido bucodispersable, o bien, que se deshaga rápidamente en la boca. En consecuencia, se debe recurrir a la alternativa de fabricar un liofilizado oral para obtener una forma farmacéutica de administración oral apta para su dispersión inmediata en la boca.

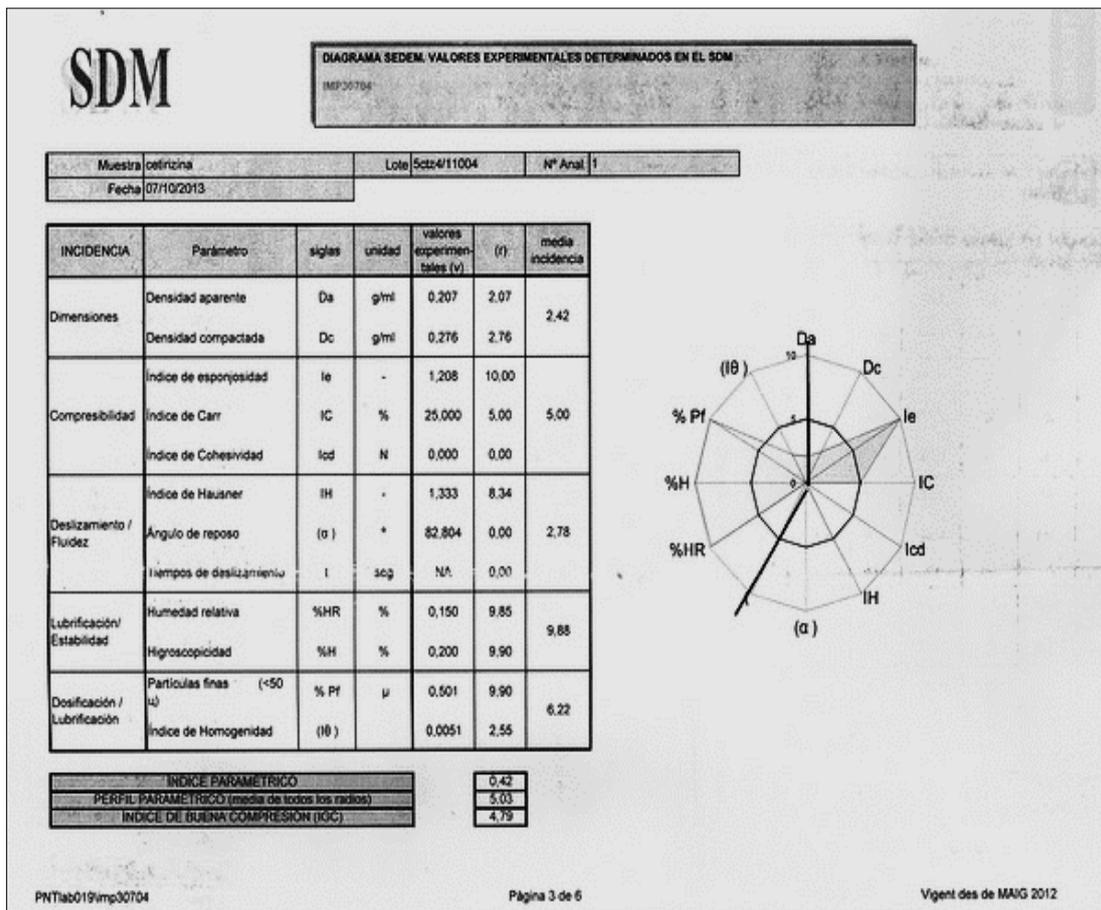


Fig. 11. Resultados del diagrama SeDeM para cetirizina dihidrocloruro.

## 5.2. MÉTODO ANALÍTICO

Se ha desarrollado un nuevo método analítico de CLAE para la identificación y cuantificación del principio activo (cetirizina dihidrocloruro) e identificación de sus productos de degradación. Para ello se ha tenido en cuenta la naturaleza hidrofílica del principio activo, y por lo tanto se ha estudiado el uso de dos tipos de material de fase estacionaria de columnas cromatográficas: C18 (más hidrofóbica, octadecilsilil), y C8 (hidrofobicidad intermedia, octilsilil). También se ha estudiado la molécula de CTZ utilizando para ello el programa SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) desarrollado por la EPA (United States Environmental Protection Agency) con el propósito de predecir a cual pH se adecuaría mejor la ionización de la CTZ (72).

### 5.2.1. Desarrollo del método analítico

Primeramente se ha analizado la estructura molecular de CTZ con el programa SPARC (72) que auxilia en predecir cuál pH es el adecuado para la ionización del principio activo, puesto que presenta la gráfica de especies de CTZ conforme el pH que se utilice (ver Fig. 12). La gráfica de especies de CTZ y pH enseña que no es recomendable utilizar un medio a pH3 para la ionización del principio activo por presentar seis especies distintas de CTZ ionizadas con el mismo pH3, sin que se presente una definición clara entre ellas. Mientras tanto, a pH2 se puede observar una especie de CTZ protonada (S6) y a pH7 una especie de CTZ anionizada (S1) (ver Fig. 12). Como dato adicional, se conoce que el principio activo es libremente soluble en agua, y prácticamente insoluble en acetona y cloruro de metileno (51); presenta valores de pKa de 2,7 (pKa1), 3,6 (pKa 2) and 7,6 (pKa 3) (73). No obstante, debido a encontrarse en la literatura métodos cromatográficos que utilizaban soluciones reguladoras a pH3, o con valores alrededor de 3 (2,8; 3,5, por ejemplo), se ha decidido considerar el pH3 en el estudio (74-76). Durante los estudios preliminares del desarrollo analítico se ha combinado diferentes proporciones de acetonitrilo y soluciones acuosas a pH3 (agua MilliQ acidificada a pH3 con ácido ortofosfórico al 85%). Los estudios preliminares se han llevado a cabo mediante inyección de solución de CTZ 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , utilizando para ello columna cromatográfica C18, con un flujo de fase móvil de 1  $\text{ml min}^{-1}$ , un volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$ , temperatura de horno de 30  $^{\circ}\text{C}$ , longitud de onda de 230 nm, en modo isocrático. Los efectos de la composición óptima de eluentes han sido estudiados, obteniéndose un tiempo de retención ( $t_R$ ) de ocho minutos para CTZ con 35:65 (v/v) de acetonitrilo y solución acuosa a pH3. Además, también se ha intentado ajustar la fase móvil -estudiándose el efecto de la proporción entre el disolvente orgánico y la solución reguladora de pH- de manera a poder alcanzar un  $t_R$  de aproximadamente 6-7 minutos para CTZ. Para reducir el  $t_R$ , se ha intentado utilizar una solución reguladora de 0,2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH7. Se ha observado que manteniéndose las mismas proporciones de disolvente orgánico y solución reguladora de pH, y pasando del pH3 al pH7 (utilizando para ello solución reguladora al 0,2 M de fosfato potásico dibásico a pH7), se ha alcanzado un  $t_R$  de 5-6 minutos.

No obstante, el pico de CTZ obtenido presentaba una ampliación de la cola. Siendo así, en vez de utilizar un par iónico para mejorar la resolución de pico, se ha cambiado la columna cromatográfica C18 (Kromasyl 100-5 C18) a una C8 (Eclipse XDB C8), y se

ha probado con las mismas condiciones anteriores: acetonitrilo y solución fosfato a pH7 (35:65, respectivamente), volumen de inyección 25  $\mu$ l, flujo 1 ml min<sup>-1</sup>, temperatura de horno 30 °C, 230 nm de longitud de onda. Eso ha resultado en la eliminación de la cola. Habiéndose determinado las proporciones de eluentes de la fase móvil isocrática y el pH de la solución acuosa a pH7, se ha obtenido el  $t_R$  deseado, y se ha establecido el método analítico para la identificación de los productos de degradación obtenidos.

### 5.2.2. Ensayo de degradación

Una vez desarrollado el método analítico, se llevó a cabo el ensayo de degradación con el objeto de detectar un perfil completo de productos de degradación. Se han realizado los ensayos bajo hidrólisis básica a temperatura ambiente, hidrólisis ácida a temperatura ambiente, hidrólisis básica a 105 °C, hidrólisis ácida a 105 °C, CTZ bajo luz ultravioleta (UV), CTZ bajo luz de infrarrojos (IR), bajo luz ambiente durante 15 días, bajo calor seco a 105 °C, humedad relativa a HR79% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33%. Se han obtenido los siguientes resultados: CTZ ha sido degradada en hasta un 19% bajo hidrólisis ácida a 105 °C, presentando cinco picos. Bajo hidrólisis básica a 105 %, CTZ se ha degradado en un 15%, presentando doce picos de degradación, seguido de luz ambiente (10%, un pico de degradación), UV (9%, cuatro picos de degradación), IR (8%, cuatro picos de degradación) y calor seco a 105 °C (3%, seis picos de degradación). CTZ ha presentado picos de productos de degradación bajo hidrólisis ácida (tres picos) y básica a temperatura ambiente con tres picos cromatográficos (ver Tabla 4 con los  $t_{Rr}$ ). No obstante, la degradación en ambos casos no ha sido sustancial (ver Tabla 5).

Comparando los perfiles cromatográficos de CTZ disuelta en solución reguladora fosfato (Fig. 13) sin condiciones de estrés (condiciones normales) con CTZ bajo condiciones de humedad HR79% (Fig. 14), se ha observado que el principio activo no ha presentado degradación sustancial bajo humedad HR79%, presentando un perfil cromatográfico similar al de CTZ en condiciones normales, a la misma concentración.

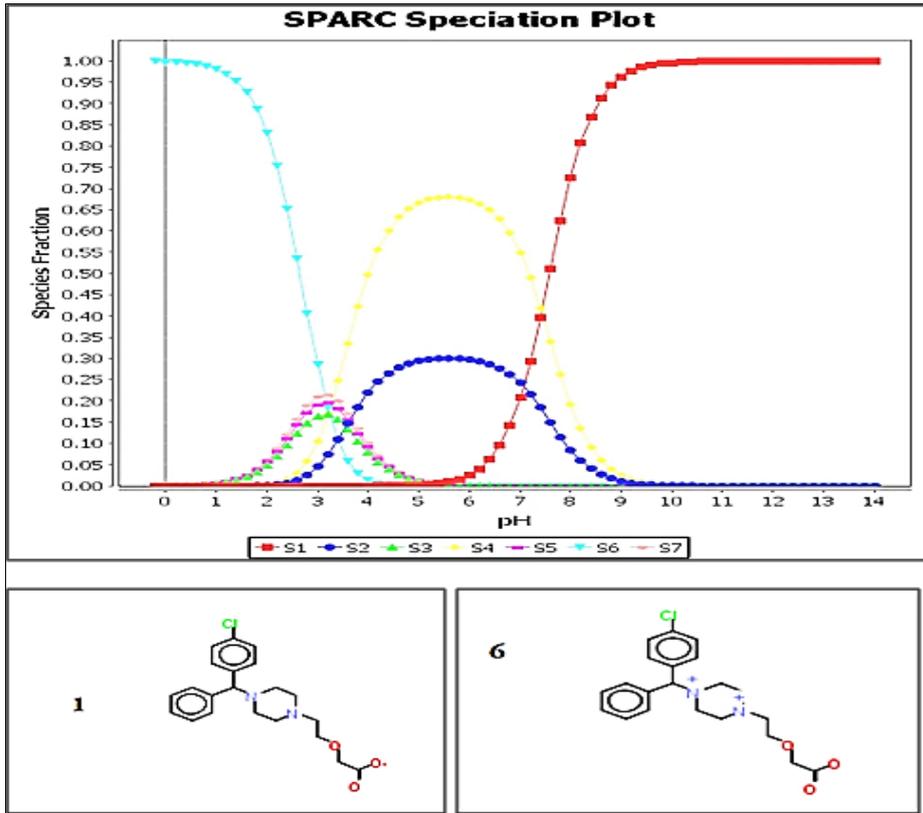


Fig. 12. Gráfica de especies de cetirizina dihidrocloruro según pH (SPARC).

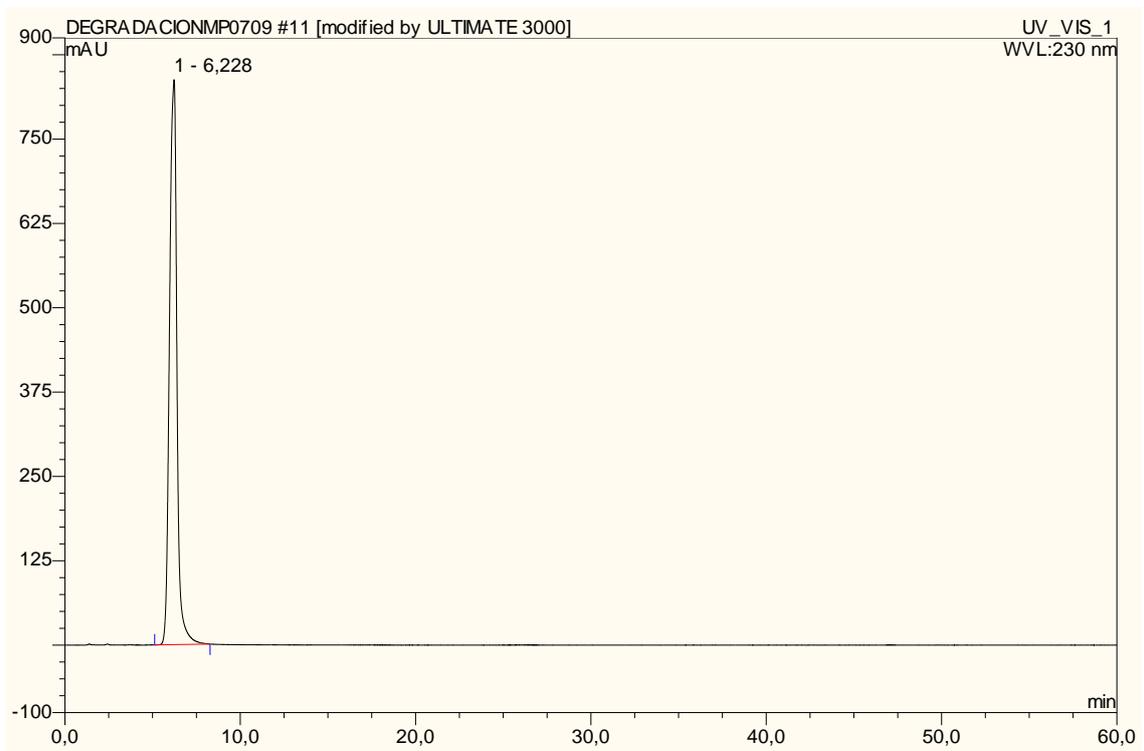


Figura 13. CTZ disuelta en solución reguladora fosfato (condiciones normales).

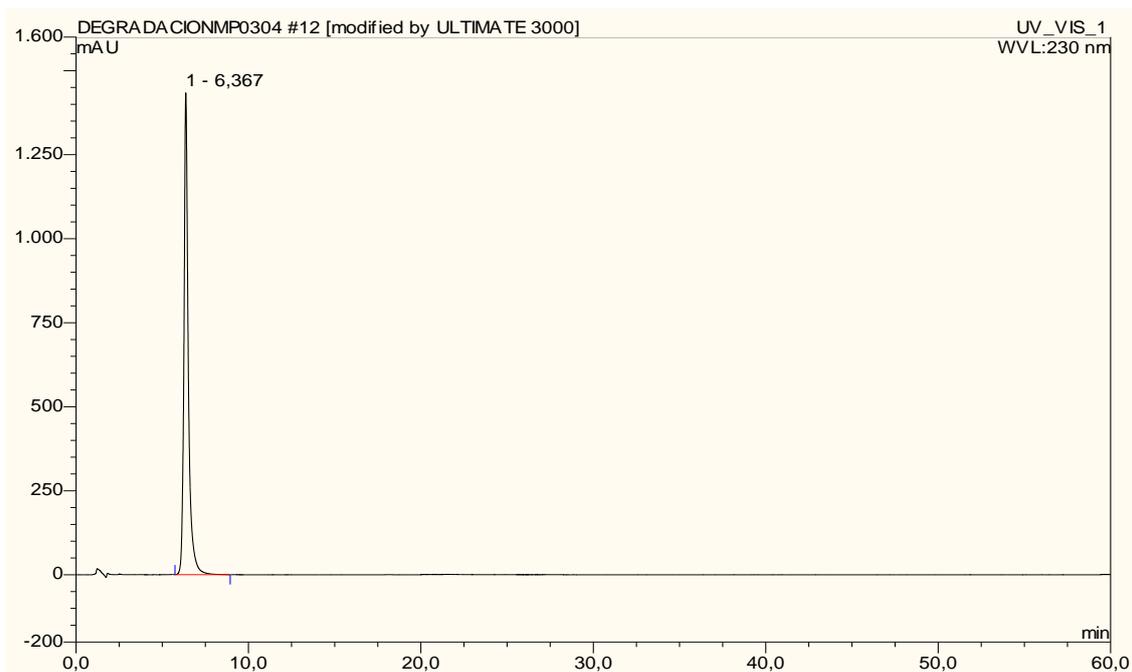


Fig. 14. CTZ bajo condiciones de Humedad HR 79%.

Bajo estrés oxidativo, CTZ ha presentado un 79% de degradación, presentando cinco picos de degradación (ver Fig. 15) y en Figura 16 se puede visualizar el espectro cromatográfico de cada producto de degradación y el principio activo.

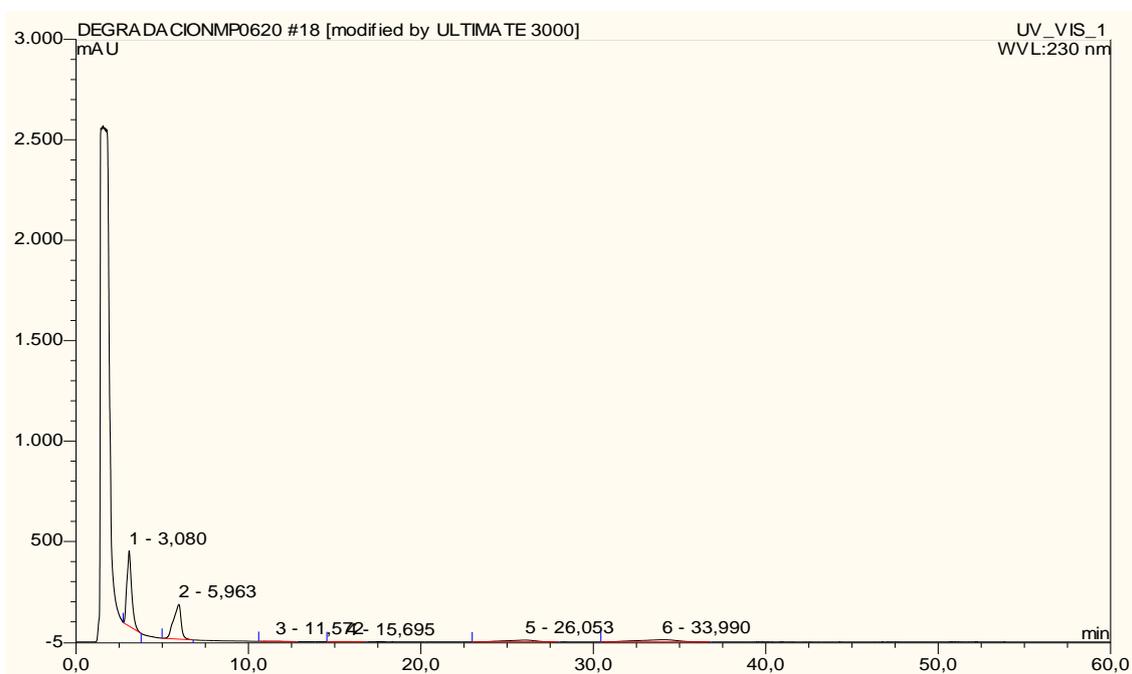


Fig. 15 CTZ bajo estrés oxidativo.

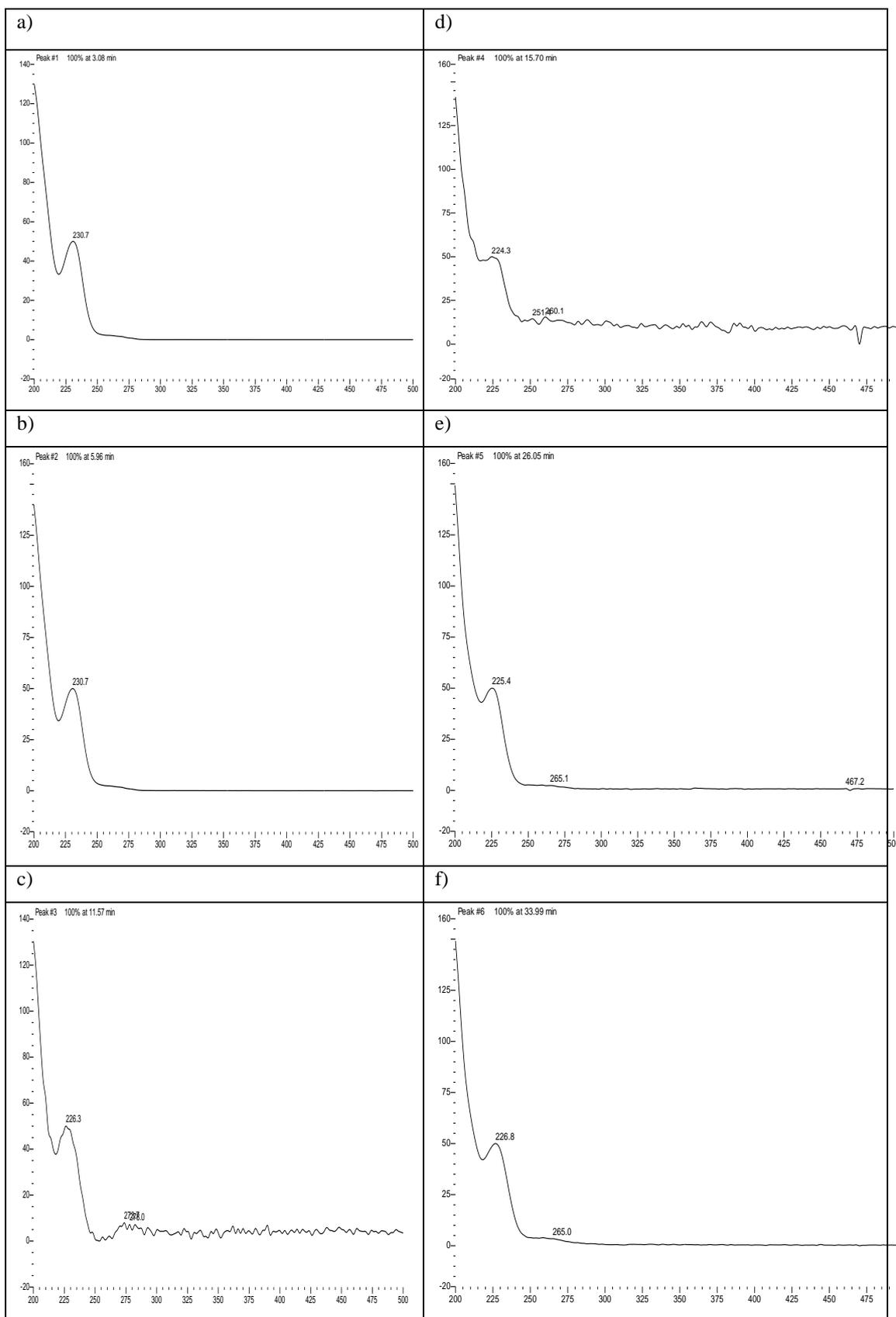


Fig. 16. Espectro cromatográfico de productos de degradación y CTZ bajo  $H_2O_2$  al 33% (p/v).

Además, el valor del pico de pureza para CTZ bajo estrés oxidativo ha sido de 998 (considerando 1000 como 100% pureza), lo que indica la presencia de un pico homogéneo (Tabla 5). No obstante, al inicio del proceso de elución, el ensayo de detector de diodo ha detectado un nivel de productos de degradación mayor que su umbral, lo que demuestra una posible saturación de la columna cromatográfica con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33%. Hay también la hipótesis de que un 79% de descomposición puede ser atribuida a la degradación de los mismos productos de degradación, lo que generaría más productos de degradación, debido a la exposición del principio activo durante 24 horas bajo estrés oxidativo. Eso lleva a la conclusión de que es necesario cambiar el procedimiento de estrés oxidativo por reducción de la concentración utilizada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33%) o reducir el tiempo de exposición del principio activo al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (24 horas), o ambos. Resultados satisfactorios se han obtenido estudiando el índice de pureza de pico para CTZ bajo condiciones de estrés, lo que confirma la alta especificidad del método analítico para CTZ (ver Tabla 5).

Tabla 4. Resumen de los picos de degradación del producto en el tiempo de retención relativo (rTR, min)

Condiciones de estrés	r <sub>TR</sub> (min)								CTZ	r <sub>TR</sub> (min)									
<b>Humedad HR79%</b>									1,00										
<b>Hidrólisis ácida *TA</b>			0,51				0,81	0,87	1,00										
<b>Hidrólisis ácida at 105 °C</b>	0,46		0,50		0,64			0,87	1,00								5,00		
<b>Luz ultravioleta (UV)</b>			0,52	0,59			0,81		1,00		2,00					4,30			
<b>Luz infrarroja (IR)</b>			0,51	0,60	0,66		0,81		1,00										
<b>Hidrólisis básica *TA</b>			0,53				0,81	0,87	1,00										
<b>Hidrólisis básica at 105 °C</b>	0,46	0,48	0,51	0,58		0,71		0,86	1,00	1,60	2,00		2,80	3,40			5,00	9,10	
<b>Calor seco a 105 °C</b>			0,50			0,72	0,80	0,90	1,00							4,30		5,00	
<b>Luz directa 15 días</b>				0,60					1,00										
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 33%</b>			0,51						1,00		1,90	2,60					4,40	5,70	
<b>Condiciones normales</b>									1,00										

Tabla 5: Determinación de pureza mediante análisis de pico cromatográfico por detector de diodos de espectro UV-Vis de CTZ y resultados de estudio de degradación

<b>Condiciones de degradación</b>	<b>Índice de pureza <sup>a</sup></b>	<b>Descomposición (%)</b>	<b>Medida de descomposición</b>
<b>Humedad HR79%</b>	952	0	Ninguna
<b>Hidrólisis ácida *TA</b>	990	0	Ninguna
<b>Hidrólisis ácida a 105 °C</b>	998	19	Sustancial
<b>Luz ultravioleta (UV)</b>	962	9	Sustancial
<b>Luz infrarroja (IR)</b>	962	8	Sustancial
<b>Hidrólisis básica *TA</b>	972	0	Ninguna
<b>Hidrólisis básica a 105 °C</b>	986	15	Sustancial
<b>Calor seco at 105 °C</b>	953	3	Sustancial
<b>Luz directa 15 días</b>	996	10	Sustancial
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 33% *TA</b>	998	79	Sustancial
<b>CTZ (sol reguladora fosfato)</b>	990	0	Condiciones normales

<sup>a</sup> indica que el índice de pureza de pico cromatográfico debe ser superior a 950, considerando 1000 como 100% pureza; \*TA: temperatura ambiente.

### 5.2.3. Validación del método

El método desarrollado ha sido validado mediante las directrices ICHQ2B (70). Los parámetros de validación incluyen: linealidad, precisión, exactitud y especificidad, LOD y LOQ (70,71).

#### 5.2.3.1. Linealidad del ensayo para principio activo

El ensayo de linealidad para CTZ se ha verificado mediante análisis por triplicado de siete concentraciones diferentes, es decir, tres rectas de rango de concentración de CTZ 130-70%. Como resultado, la ecuación de regresión lineal encontrada ha sido de  $Y = 769,56 X + 14,573$  ( $r^2 = 0,9994$ ),  $k = 3$  (número de replicados),  $n = 7$  (niveles de concentración),  $650 \mu\text{g ml}^{-1}$  (= 0,65 mg/ml) a  $350 \mu\text{g ml}^{-1}$  (= 0,35 mg/ml) para CTZ. En el cual, Y era la variable dependiente, X era la variable independiente, 769,56 era la pendiente y que mostró un cambio en la variable (Y, ordenada en el origen) dependiente por unidad de cambio en la variable (X) independiente; 14,573 ha sido el ordenada en el origen es decir, el valor de Y variable cuando  $X = 0$ . Abajo se enseñan los resultados cromatográficos de la recta nº 1 al 70-130%, seguido de los resultados de la recta de regresión y resultados estadísticos.

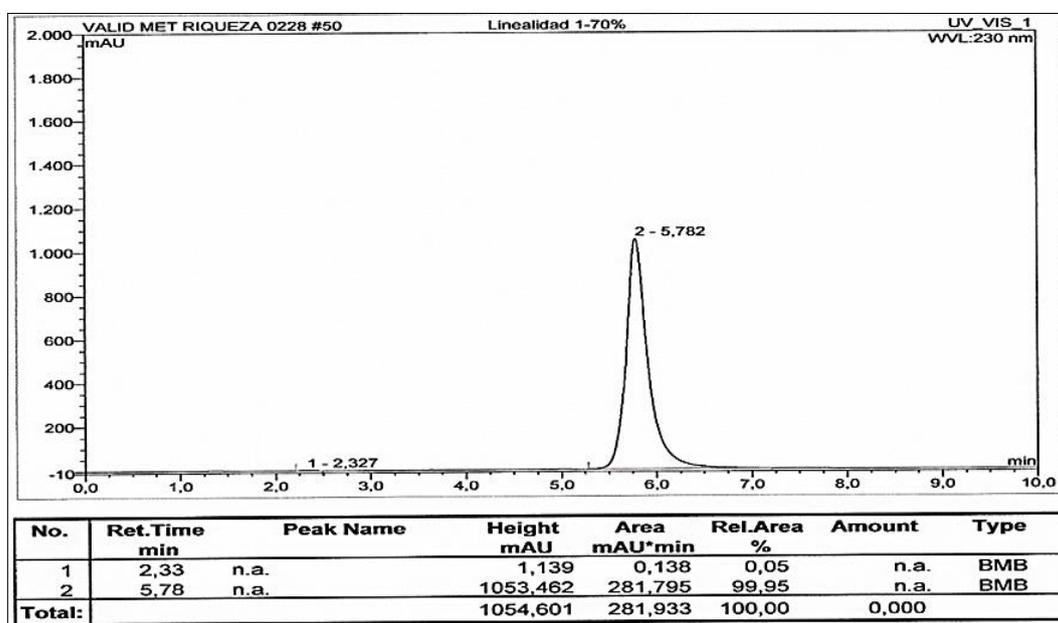


Fig. 17. Linealidad ensayo para CTZ al 70% (= 0,350 mg/ml).

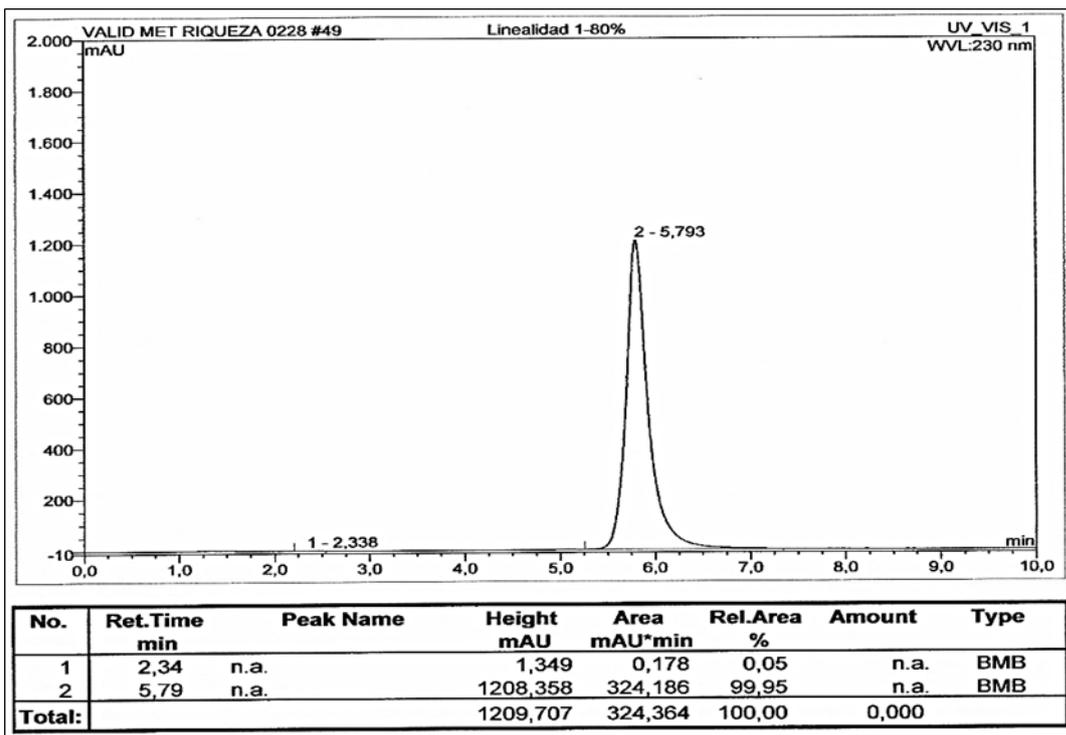


Fig. 18. Linealidad ensayo para CTZ al 80% (=0,400 mg/ml).

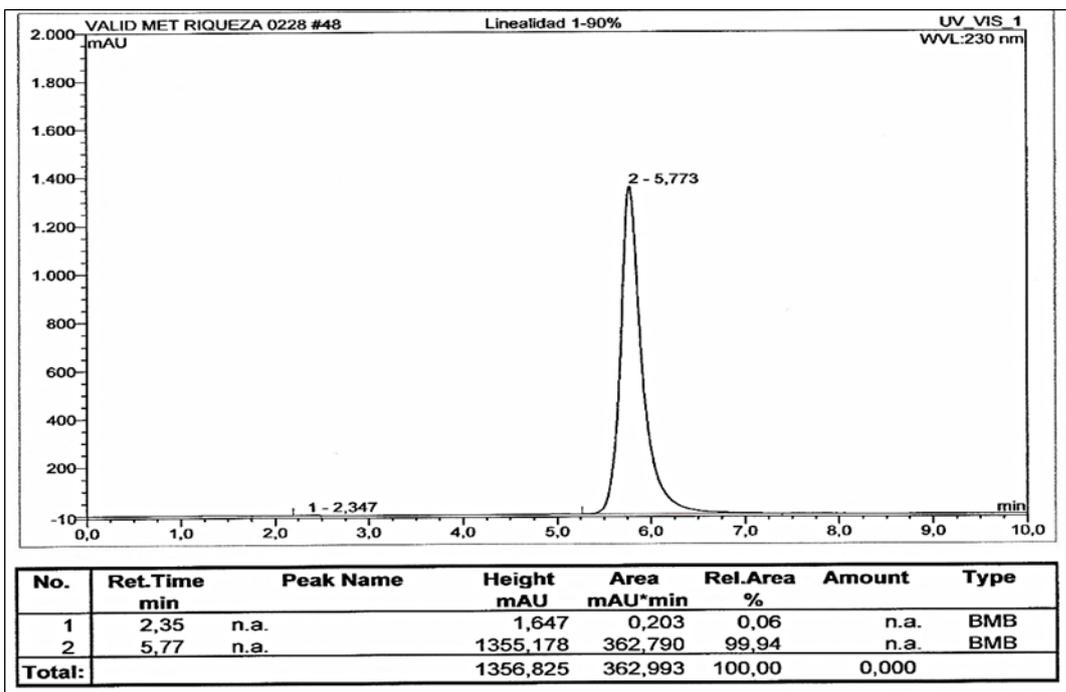


Fig. 19. Linealidad ensayo para CTZ al 90% (= 0,450 mg/ml).

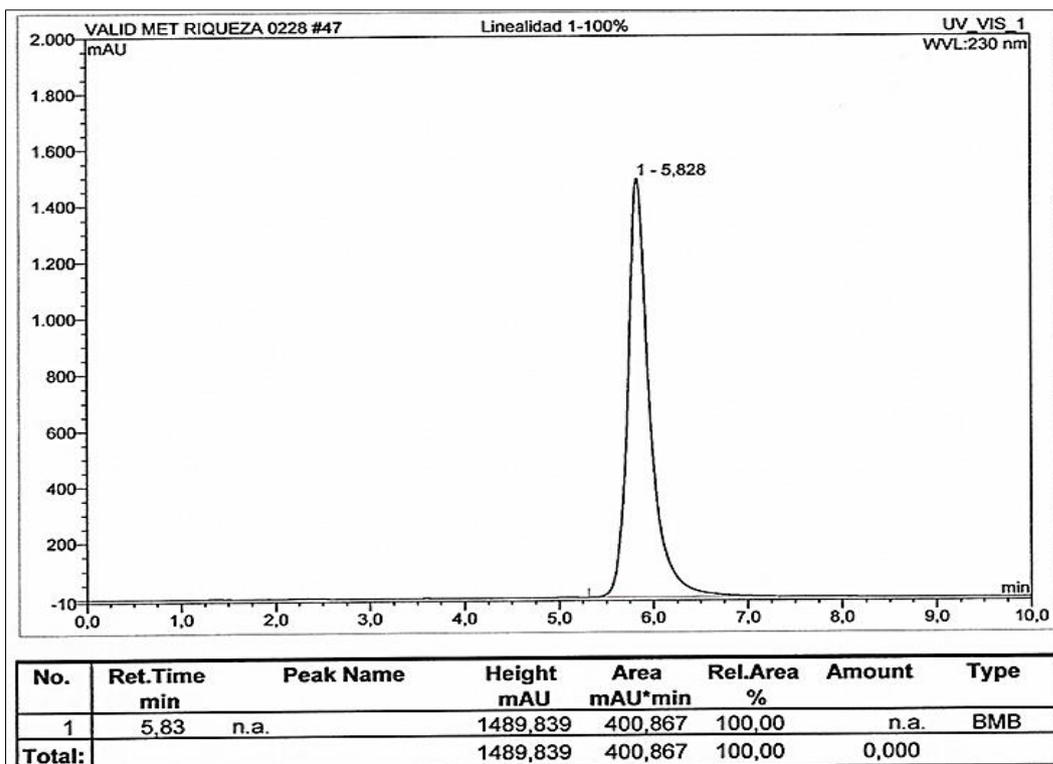


Fig. 20. Linealidad ensayo para CTZ al 100% (=0,500 mg/ml).

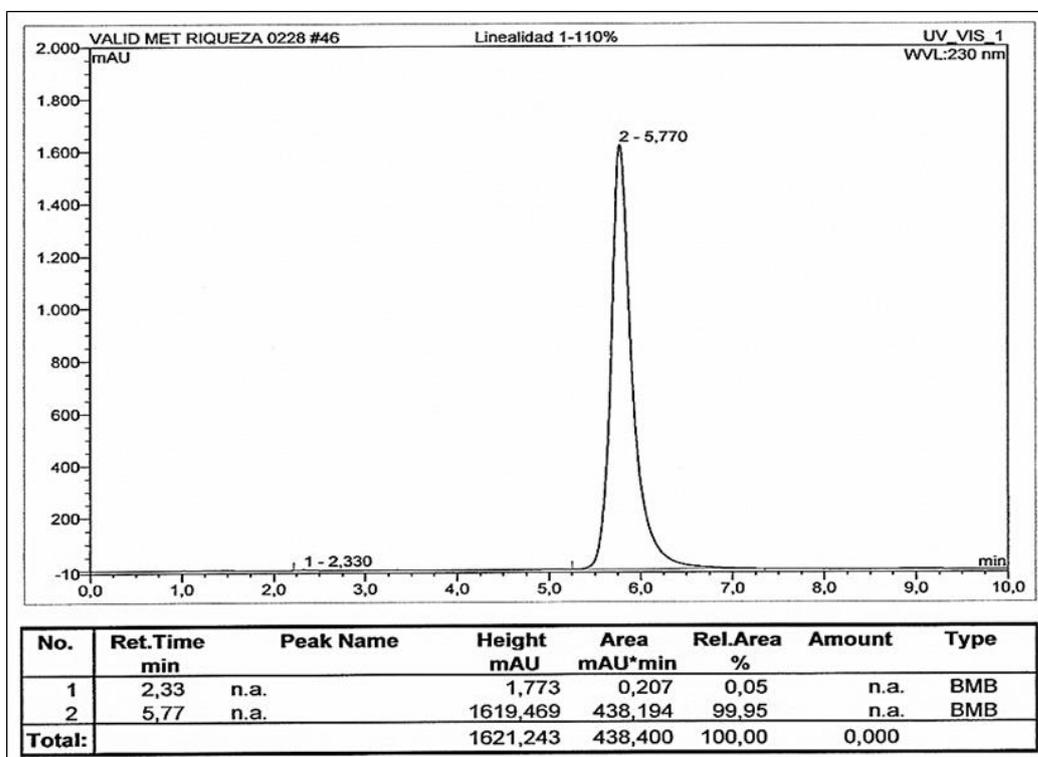


Fig. 21. Linealidad ensayo para CTZ al 110% (0,550 mg/ml).

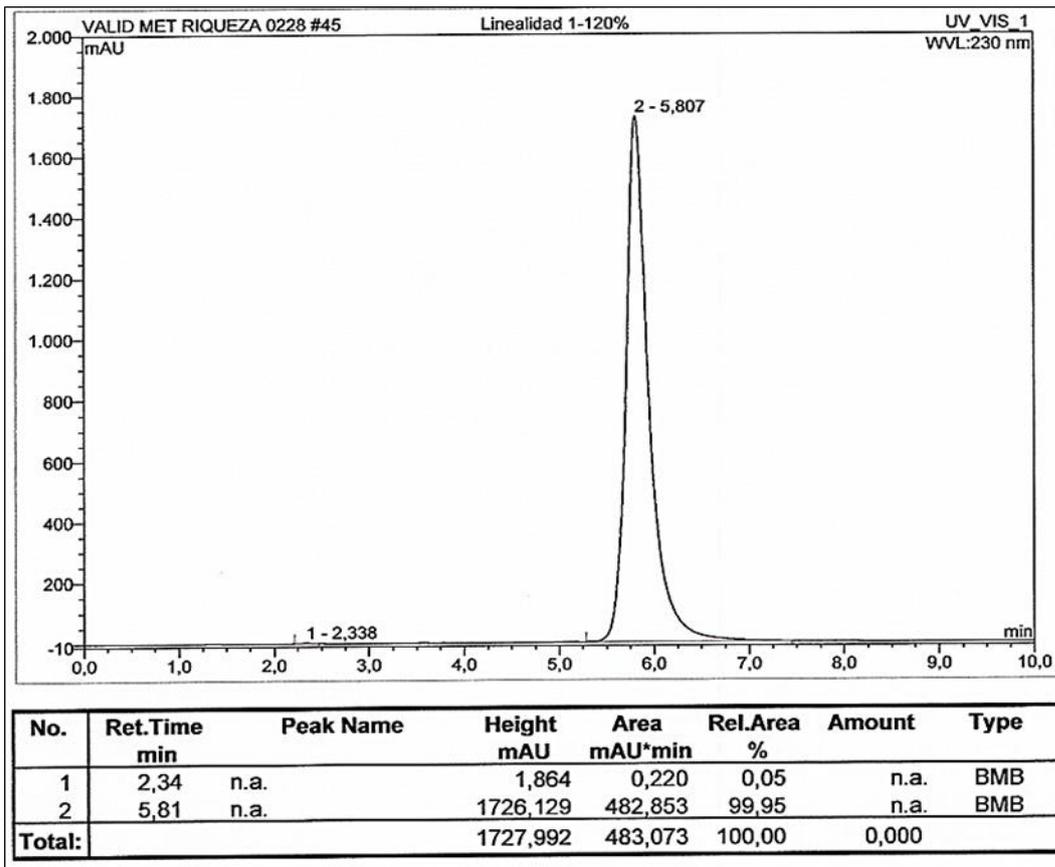


Fig. 22. Linealidad ensayo CTZ al 120% (=0,600 mg/ml).

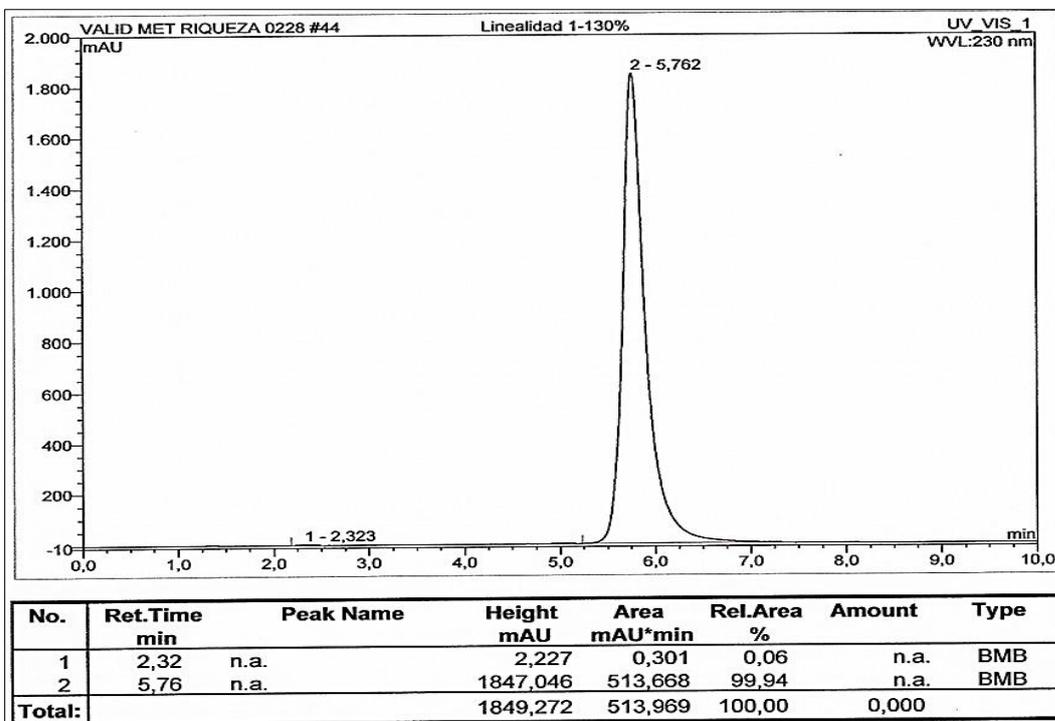


Fig. 23. Linealidad ensayo CTZ al 130% (=0,650 mg/ml).

La ecuación del modelo ajustado para la recta n° 1 de 70-130% (0,350-0,650 mg/ml) es:

$$\text{Áreas} = 11,9229 + 777,398 * \text{concentración}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre áreas y concentración para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico  $r^2$  indica que el modelo explica un 99,9001% de la variabilidad en áreas. El coeficiente de correlación (r) es igual a 0,9995, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 2,90892.

El error absoluto medio (MAE) de 2,02242, es el valor medio de los residuos.

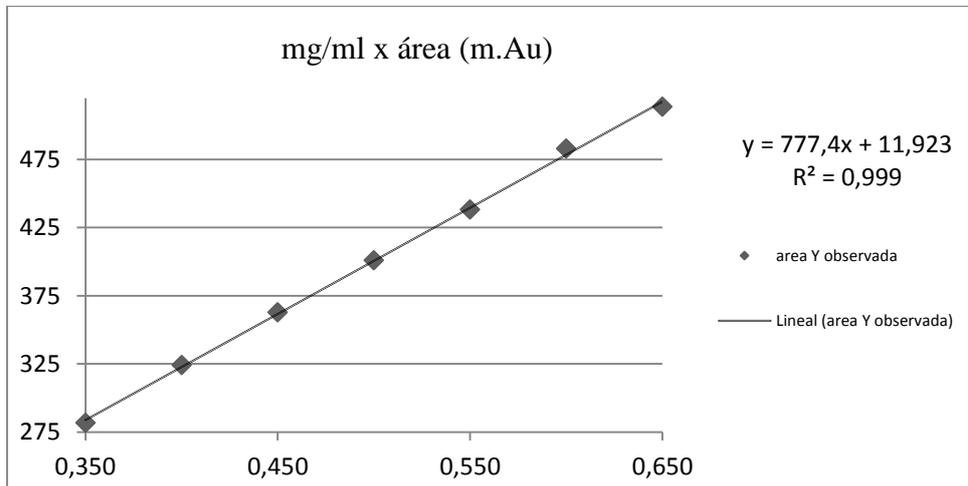


Fig. 24. Recta de regresión lineal para la recta n° 01 de concentración 0,350-0,650 mg/ml del ensayo para CTZ.

### 5.2.3.2. Precisión para ensayo del principio activo

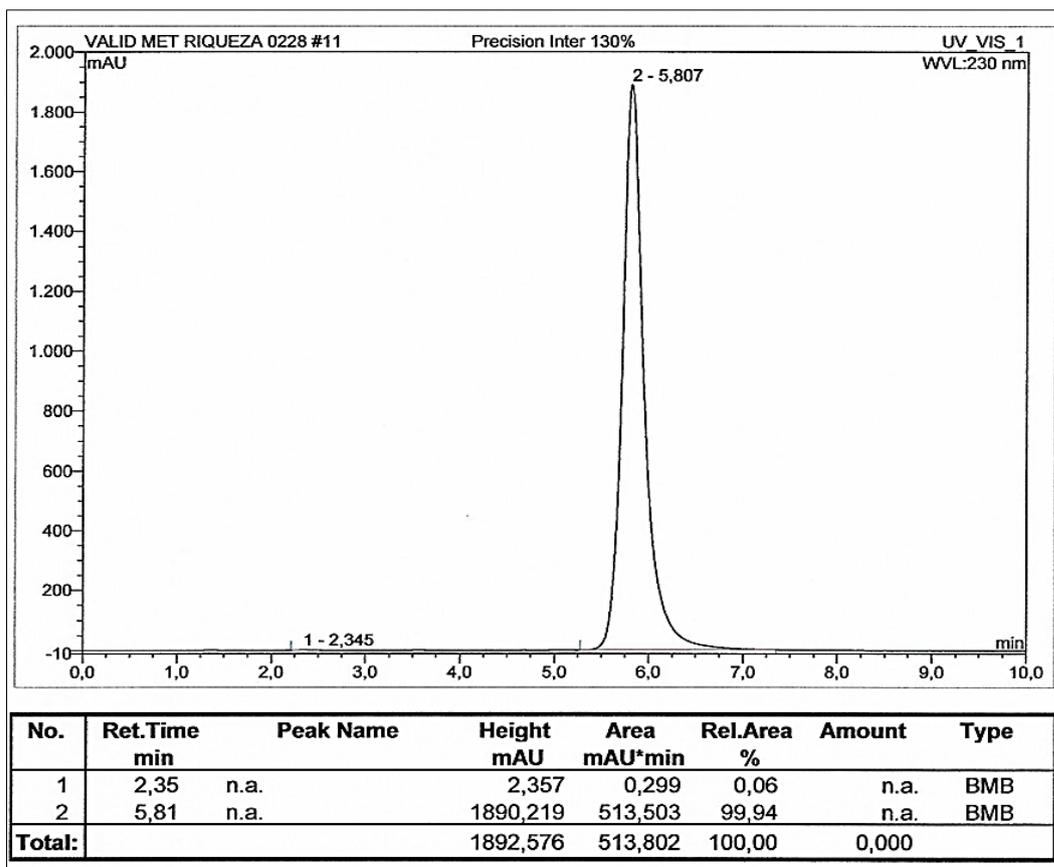


Fig. 25. Precisión intermedia para concentración al 130% (=0,650 mg/ml).

En cuanto a la precisión analítica para el ensayo de CTZ (ver Tabla 6), se han preparado tres niveles de concentración (0,650, 0,500 and 0,350 mg/ml, correspondiendo a las concentraciones al 130, 100 y 70%), con 10 inyecciones de cada muestra, por día. Abajo se indican tres cromatogramas del ensayo de precisión analítica:

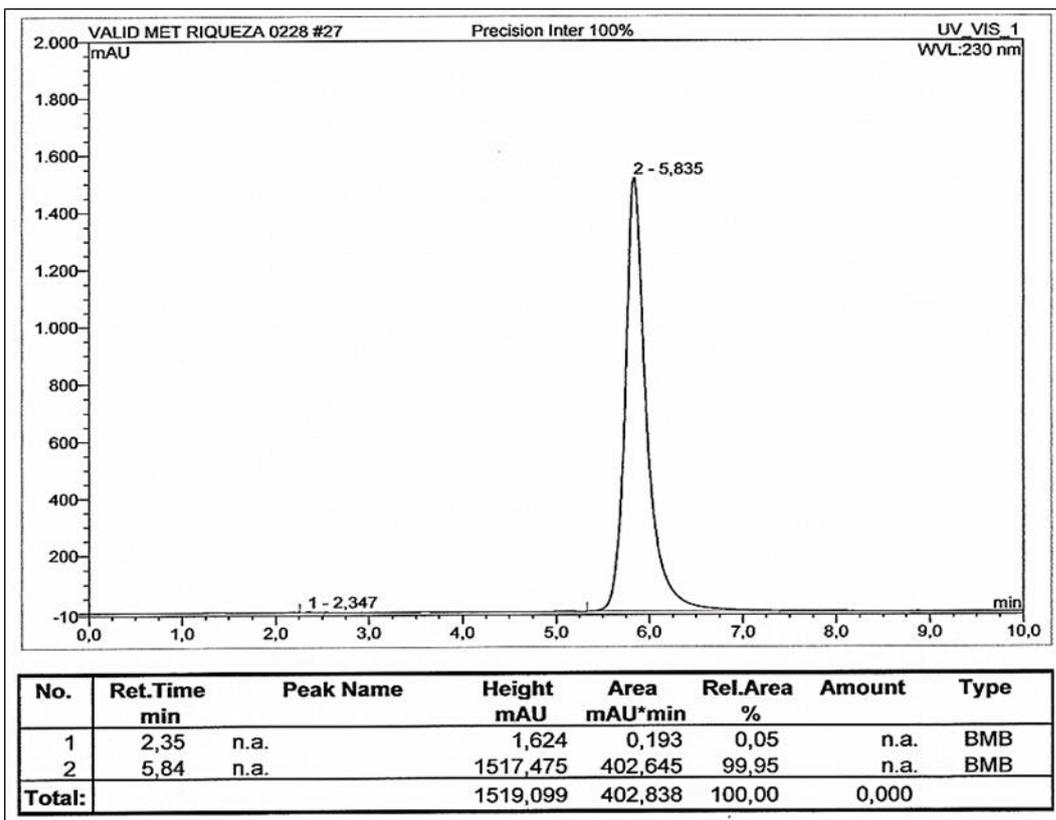


Fig. 26. Precisión intermedia para concentración al 100% (=0,500 mg/ml).

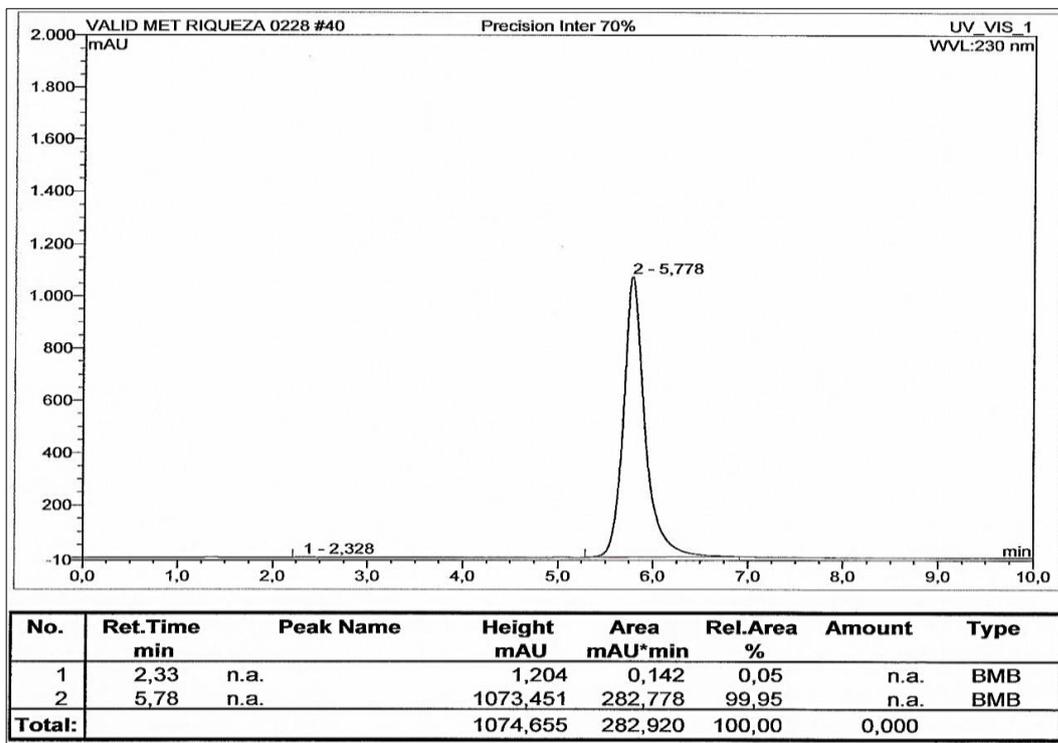


Fig. 27. Precisión intermedia para concentración al 70% (=0,350 mg/ml).

Los resultados obtenidos han demostrado que el método desarrollado es reproducible al presentar un coeficiente de variación (CV%) inferior al 2,7% para las tres concentraciones estudiadas (al 70, 100 y 130%), según directrices AOAC (71), con un 1,43% para  $t_R$  y 1,65% para área de pico el día 1, y un 1,03% para  $t_R$  y 1,20% para área de pico el día 2 (ver Tabla 6).

#### 5.2.3.3. Exactitud para ensayo del principio activo

En términos de exactitud para las concentraciones al 70-130%, según los resultados obtenidos (ver Tabla 7), el porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango de 98,56 a 101,44, estando dentro de los límites establecidos por la AOAC (71) que son 98-102%, lo cual indica la exactitud del método analítico desarrollado para CTZ.

#### 5.2.3.4. Determinación de los límites de cuantificación y detección

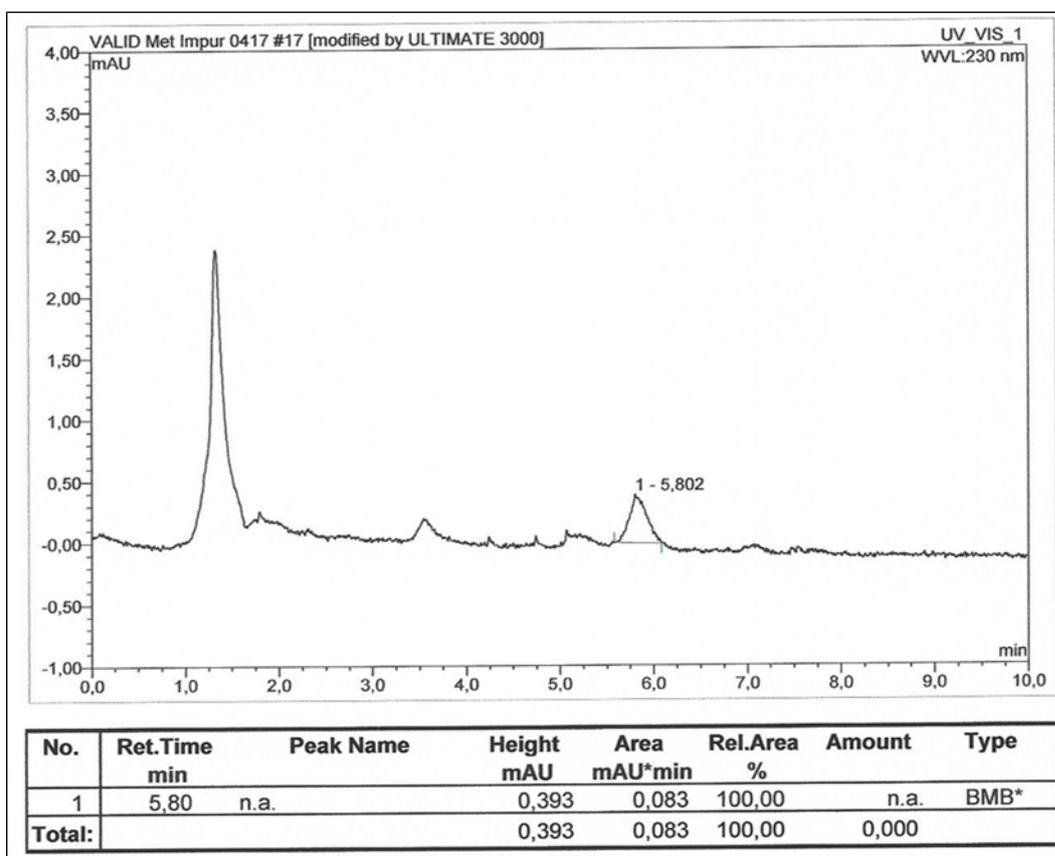


Fig. 28. Cromatograma de la concentración 0,000125 mg/ml (=0,125 µg/ml) extraído del estudio de linealidad para establecer los límites de cuantificación y detección para el principio activo.

Se han estudiado siete rectas independientes de dilución, es decir, siete replicados ( $K = 7$ ), cada recta con seis concentraciones diferentes ( $n = 6$ ) en el rango de  $5-0,125 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Se ha calculado el LOD y el LOQ en relación con las desviaciones estándar (SD) de las ordenadas en el origen de las líneas de regresión de las siete diluciones seriadas de las seis concentraciones diferentes mencionadas anteriormente, mediante promedio de las pendientes de las rectas de calibración multiplicado por 3,3 y 10, respectivamente, obteniéndose un LOD de  $0,056 \mu\text{g ml}^{-1}$  y un LOQ de  $0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

No obstante, se ha demostrado que el valor de LOQ de  $0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$  no era lineal con la recta de seis concentraciones diferentes ( $n= 6$ ) Teniendo en cuenta el rango definido por la ICH para productos de degradación, por razones de linealidad se ha considerado el rango alrededor de un límite sugerido (probable) (70). De esa manera, la linealidad se ha establecido desde un LOQ a 120 %. Así, un nuevo LOQ con  $SD = 0,0111 \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $CV \% = 6,1605\%$  ha sido establecido ( $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

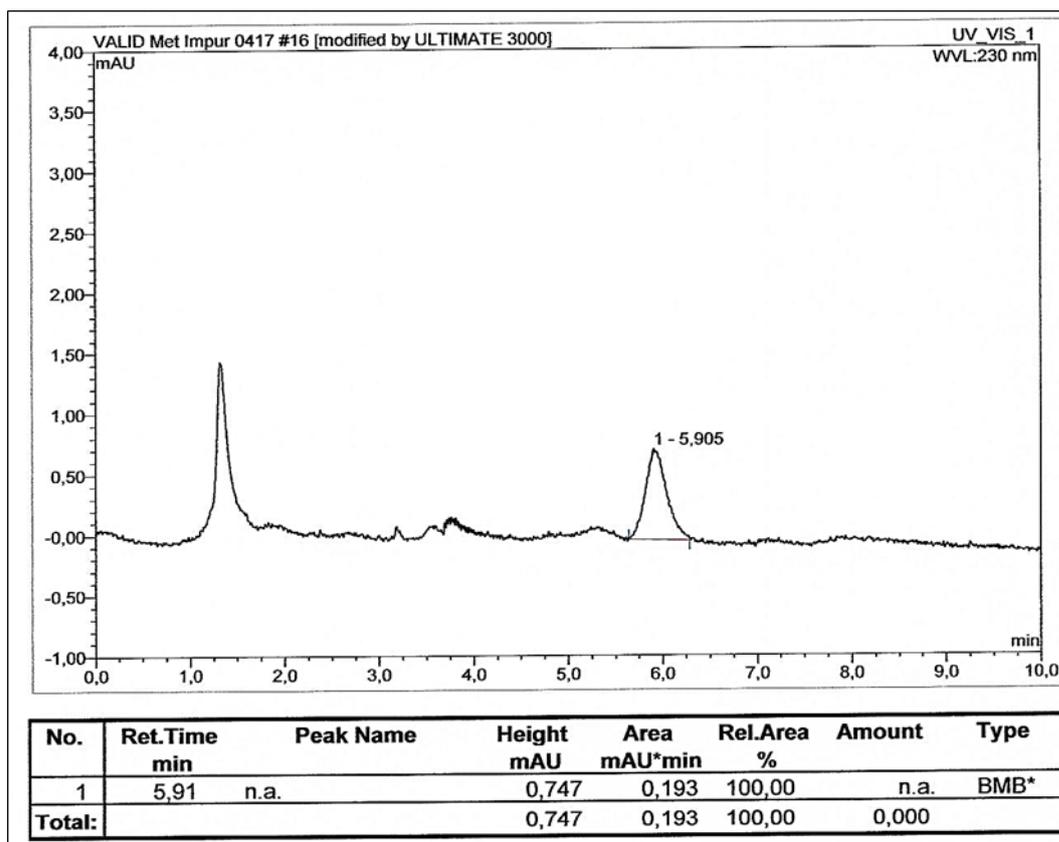


Fig. 29. Cromatograma del estudio de linealidad  $0,25 - 5 \mu\text{g/ml}$  ( $= 0,00025-0,005 \text{ mg/ml}$ ).

Tabla 6. Reproducibilidad y precisión intermedia de acuerdo con el tiempo de retención ( $t_R$ ) y área de pico para ensayo con CTZ

$t_R$				Área de pico	
Día	mg mL <sup>-1</sup>	Promedio $\pm$ <sup>a</sup> SD (min)	<sup>c</sup> CV (%)	Promedio $\pm$ <sup>a</sup> SD (mAU.min)	<sup>c</sup> CV (%)
		<sup>b</sup> K = 10		<sup>b</sup> K = 10	
1	0,650	5,79 $\pm$ 0,0274	0,4747	512,54 $\pm$ 1,7865	0,5365
	0,500	5,79 $\pm$ 0,0327	0,5646	399,69 $\pm$ 1,9090	0,4777
	0,350	5,80 $\pm$ 0,0228	0,3929	281,21 $\pm$ 1,7867	0,6353
2	0,650	5,77 $\pm$ 0,0195	0,3384	511,75 $\pm$ 2,2059	0,4310
	0,500	5,78 $\pm$ 0,0149	0,2584	399,54 $\pm$ 1,5972	0,3997
	0,350	5,80 $\pm$ 0,0248	0,4279	281,63 $\pm$ 1,0483	0,3722

<sup>a</sup> SD (Desviación estándar) ; <sup>b</sup> K (número de inyecciones); <sup>c</sup> CV% (coeficiente de variación %)

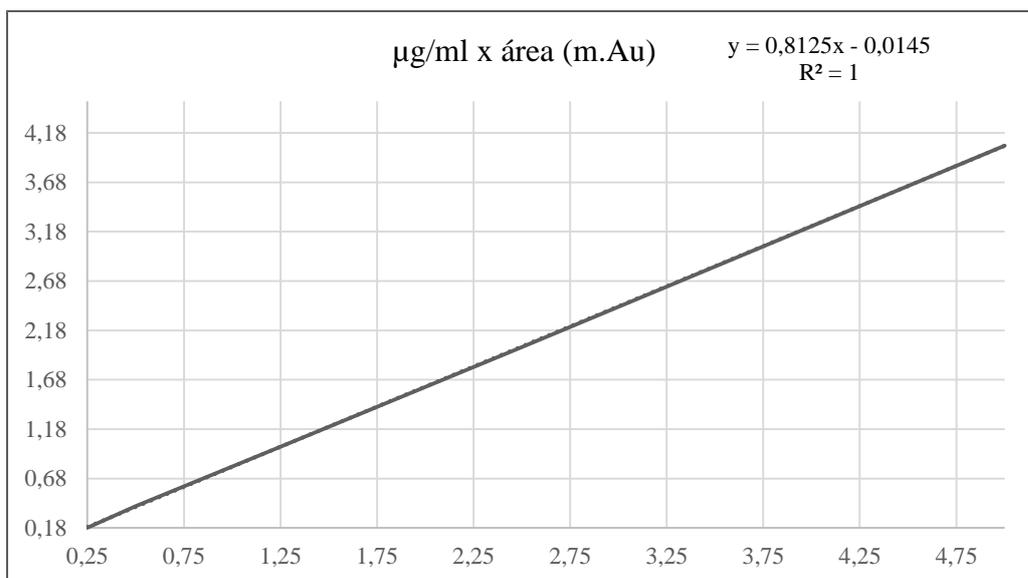


Fig. 30. Recta de regresión lineal para rango 0,25-5 µg/ml (= 0,00025-0,005 mg/ml).

#### 5.2.3.5. Linealidad, precisión y exactitud del método para 0,25 – 5 µg/ml

En base a los resultados obtenidos de LOQ, se define la ecuación de regresión lineal calculada de  $Y = 0,8125X - 0,0145$ , con una  $r^2 = 0,9999$ , para  $n = 5$  (niveles de concentración),  $k = 7$  (número de replicados), 0,25-5 µg ml<sup>-1</sup> (ver Fig.30 y Tabla 8).

Considerando los resultados obtenidos de validación del método analítico CLAE para el rango de 0,25-5 µg/ml (ver Tablas 8 y 9), se ha visto que el método desarrollado cumple con la normativa AOAC en cuanto al CV% permitido (2,7% para precisión o reproducibilidad, Tabla 8) y rango (de 90-110% para recuperación, Tabla 9), lo que confirma la aplicabilidad del método analítico en la identificación y cuantificación del principio activo.

Tabla 7. Concentraciones detectadas ( $\mu\text{g/ml}$ ), error relativo (en %), recuperación (en %) para ensayo con CTZ

<sup>a</sup> Concentración teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentración detectada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Error relativo %	<sup>b</sup> Recuperación %	Recuperación promedio	<sup>c</sup> Recuperación (SD)
650	641,29	1,25	98,75	98,66	0,09
650	641,27	1,36	98,65		
650	640,67	1,45	98,56		
500	500,96	0,19	100,19	100,49	0,57
500	500,71	0,14	100,14		
500	505,80	1,14	101,16		
350	352,16	0,61	100,61	100,95	0,43
350	352,77	0,78	100,79		
350	355,05	1,42	101,44		

<sup>a</sup>  $650 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,650 \text{ mg/ml} = 130\%$

<sup>a</sup>  $500 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,500 \text{ mg/ml} = 100\%$ ,

<sup>a</sup>  $350 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,350 \text{ mg/ml} = 70\%$ ;

<sup>b</sup> Límites de recuperación (98-102%);

<sup>c</sup> SD (Desviación estándar)

Tabla 8. Precisión: promedio, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV%) del área de pico en mAU (5 – 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Concentración teórica ( $\mu\text{g/ mL}$ )	Promedio de concentración $\pm$ <sup>a</sup> SD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( <sup>b</sup> k=7)	<sup>c</sup> CV (%)
5,000	4,0495 $\pm$ 0,1040	2,5701
2,500	2,0121 $\pm$ 0,0251	1,2502
1,250	1,0012 $\pm$ 0,0326	3,2622
0,500	0,4021 $\pm$ 0,0327	8,1334
0,250	0,1818 $\pm$ 0,0111	6,1605

<sup>a</sup>SD (Desviación estándar); <sup>b</sup>k (número de replicados); <sup>c</sup>CV% (coeficiente de variación).

Tabla 9. Exactitud: Error relativo y porcentaje de recuperación (rango 5 – 0,25 µg/ml)

<b>Concentración µg/ml</b>	<b>Concentración promedio encontrada (µg/ml) (<sup>a</sup>K = 7)</b>	<b><sup>b</sup>Error relativo promedio (%)</b>	<b><sup>c</sup>Promedio de recuperación%</b>	<b><sup>d</sup>SD% de recuperación</b>
5	5,000	0,620	100,070	0,74
1,25	1,248	3,310	99,840	4,10
0,25	0,235	9,390	94,210	10,00

<sup>a</sup> K=7 (número de replicados); <sup>b</sup> error relativo promedio (%), <sup>c</sup> promedio de recuperación (%), <sup>d</sup> SD desviación estándar.

### 5.3. PREFORMULACIÓN Y FORMULACIÓN DEL LIOFILIZADO ORAL

El objetivo del estudio de preformulación y formulación ha sido el de desarrollar un liofilizado oral (LO) que presentara ausencia de formas metaestables (detectadas mediante técnica DSC) y tuviera un aspecto final redondo y con sabor agradable, sin grietas y fácil de extraer del molde de PVC, tras aplicarse ciclo de liofilización de entre 24-28 horas (congelación a -40 °C durante mínimo 2 horas, secado primario con presiones entre 125 a 96 µbar, y secado secundario hasta 40 °C).

Para ello se han llevado a cabo estudios de DSC y FDM para detectar la mejor combinación de principio activo y excipiente (s), pruebas de viabilidad de liofilización en vial y en moldes de PVC, y demás ensayos para caracterizar tanto la fórmula en estado líquido como sólido.

#### 5.3.1. Ciclo de liofilización

El ciclo estándar de liofilización consiste de un periodo de congelación a -40 °C de mínimo 2 horas (congelación del producto líquido en moldes de PVC), con secado primario aplicando presión de vacío entre 95-125 µBar y secado secundario a 40 °C.

El ciclo de liofilización completo (secado primario y secundario) es de 24-28 h.

#### 5.3.2. Pruebas de viabilidad de liofilización en vial y en moldes de PVC

En las pruebas iniciales de viabilidad de liofilización, tanto en vial como en moldes de PVC, la concentración de CTZ utilizada ha sido de 1% (p/v), de modo que 1 ml de solución (con o sin excipiente) presentara una pastilla liofilizada equivalente a 10 mg de principio activo.

##### 5.3.2.1. Manitol y principio activo en vial

Primeramente se ha investigado buscando como criterio inicial el aspecto final de una pastilla liofilizada con el principio activo y el excipiente manitol como único agente de carga en viales de cristal. Se han elaborado soluciones de CTZ al 1% (p/v) con manitol a tres distintas concentraciones (0,25; 0,5 y 1%, p/v). Cada vial se dosificó con 1 ml, mediante uso de pipeta automática. De esa manera, cada vial presentó una pastilla con 10 mg de CTZ (ver Fig. 31).



Fig. 31. De izquierda a derecha: resultados de la primera prueba de viabilidad de liofilización con ceftriaxona dihidrocloruro al 1% (p/v) y distintas concentraciones de manitol (0,25; 0,5 y 1% p/v).

Tras el proceso de liofilización, se ha visto que las concentraciones con 0,25; 0,5 y 1% (p/v) de manitol eran muy bajas para que se generara una pastilla robusta; es decir, presentaban poco agente de carga (ver Fig. 31). Siendo así, se ha probado liofilizar manteniendo la misma concentración de principio activo (CTZ al 1% p/v) incrementando la concentración del excipiente manitol al 2% (p/v). Con una mayor concentración de agente de carga, se obtuvieron pastillas más compactas. No obstante, se consideró que era una pastilla demasiado grande para una dosis de 10 mg. Para reducir el tamaño de la pastilla, se llevan a cabo pruebas de viabilidad de liofilización con un excipiente con función aglutinante, el PVP K30.

Otro detalle que se ha observado tras los primeros ensayos fue el resultado de liofilizar solamente el principio activo, sin presencia de excipiente. La liofilización al 1% CTZ (p/v) ha resultado en una pastilla compacta y con un aspecto cristalino (ver Fig. 31).

#### 5.3.2.2. PVP K30 y principio activo en vial y en molde de PVC

El PVP K30 se utiliza en formulaciones de comprimidos por vía oral como aglutinante. Buscando esta misma función en la formulación del LO y observando estudios que utilizan el excipiente PVP en concentraciones de alrededor de 0,8% al 1,4% (p/v), se han liofilizado en vial soluciones de PVP K30 al 1, 3 y 5% (p/v) manteniendo la concentración de CTZ al 1% (p/v) para observar el aspecto final de la pastilla liofilizada (Fig. 32). Se

obtuvieron pastillas compactas para la concentración al 5% (p/v) pero con un aspecto poco uniforme para las concentraciones al 1 y al 3% (p/v). Se vuelve a liofilizar la concentración al 5% (p/v) con principio activo, en molde de PVC ovalados de 10 mm de altura por 15 mm de largo, con una capacidad de 1 ml. Algunos liofilizados presentaron un aspecto agrietado, con un resultado poco uniforme, deduciéndose que el agrietamiento se debiera posiblemente a falta de agente de carga para conseguir un liofilizado compacto dentro del alveolo.

### 5.3.2.3. Principio activo, manitol y PVP K30 en vial

Tras las pruebas iniciales de manitol al 2% (p/v) en vial, y PVP K30 al 5% (p/v) en vial y en molde, se vuelve a probar con PVP K30 al 5% (p/v) en vial con 2% (p/v) de manitol (Fig. 32), para observar el aspecto final de la combinación entre los dos excipientes y el principio activo. Se obtuvieron pastillas compactas. Las concentraciones de PVP K30 al 1 y 3% (p/v) con manitol al 2% (p/v) y CTZ al 1% (p/v) presentaron estructuras liofilizadas poco uniformes en su superficie.

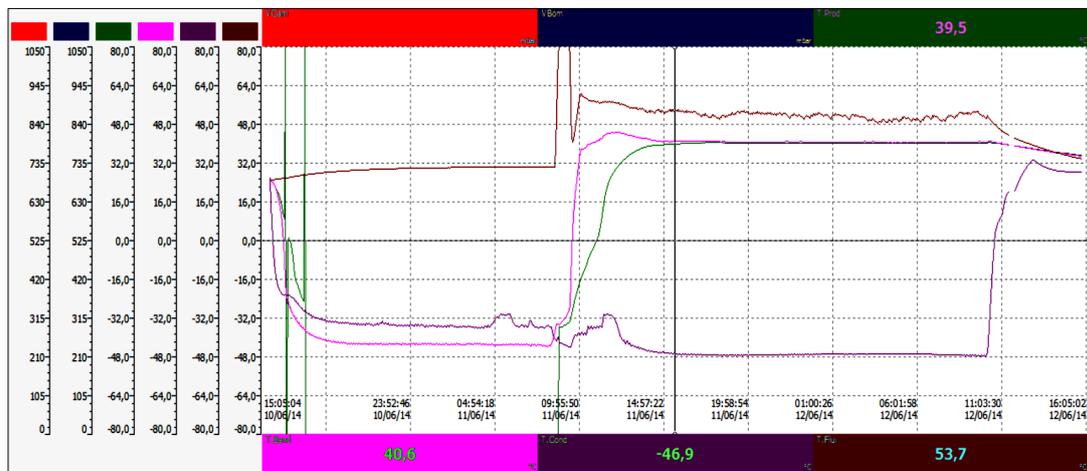


Fig. 32. Ciclo de liofilización aplicado a soluciones de PVP K30 al 1, 3 y 5% (p/v) con principio activo al 1% (p/v) en vial.

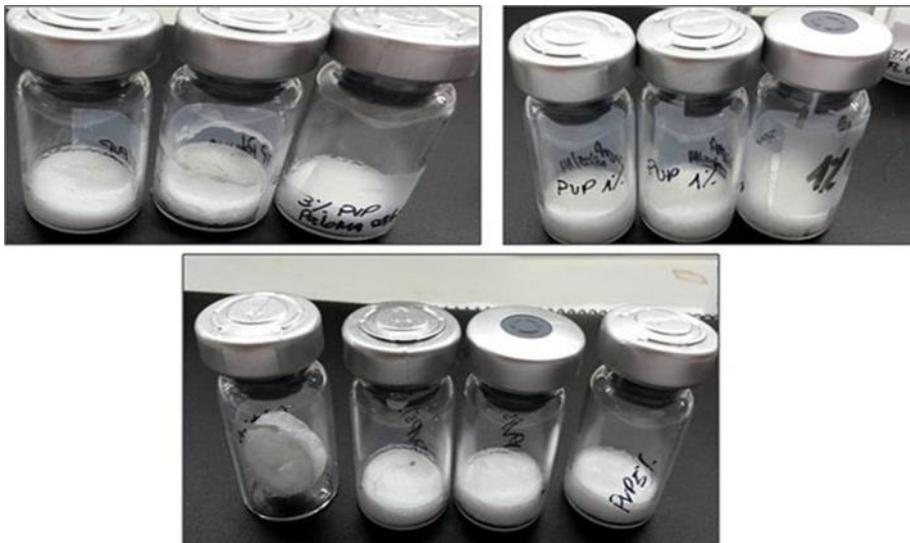


Fig. 33. Superior: pruebas con manitol al 2% (p/v), CTZ al 1% (p/v) y PVP K30 al 3% (p/v) (izquierda) y al 1% (p/v) (derecha). Inferior: figura que compara la pastilla liofilizada de CTZ al 1% (p/v) (primera a la izquierda) con tres pastillas liofilizadas de CTZ al 1% (p/v), manitol al 2% (p/v) y PVP K30 al 5% (p/v).

#### 5.3.2.4. Principio activo, PVP K30 y manitol en molde PVC

Tras llevarse a cabo las pruebas de viabilidad de liofilización con manitol al 2% (p/v), PVP K30 al 5% (p/v) y CTZ al 1% (p/v) en vial de cristal (con un resultado aceptable en cuanto a pastilla compacta), se decide probar dicha combinación en moldes de PVC con una dosis de 1 ml, correspondiendo a 10 mg de CTZ.

Para ello, se utilizaron dos tipos de molde de PVC:

- molde redondo de 5 mm de altura y 15 mm de diámetro, con una capacidad de 1 ml
- molde ovalado de 10 mm de altura por 15 mm de largo, con una capacidad de 1 ml

Las muestras liofilizadas en moldes de alveolo redondo presentaron una superficie poco uniforme. Algunos LO redondos se han roto durante el proceso de liofilización. Las primeras pruebas con alveolo ovalado han presentado un liofilizado sin grietas, que se rompían al extraerse del molde (ver Fig. 36).

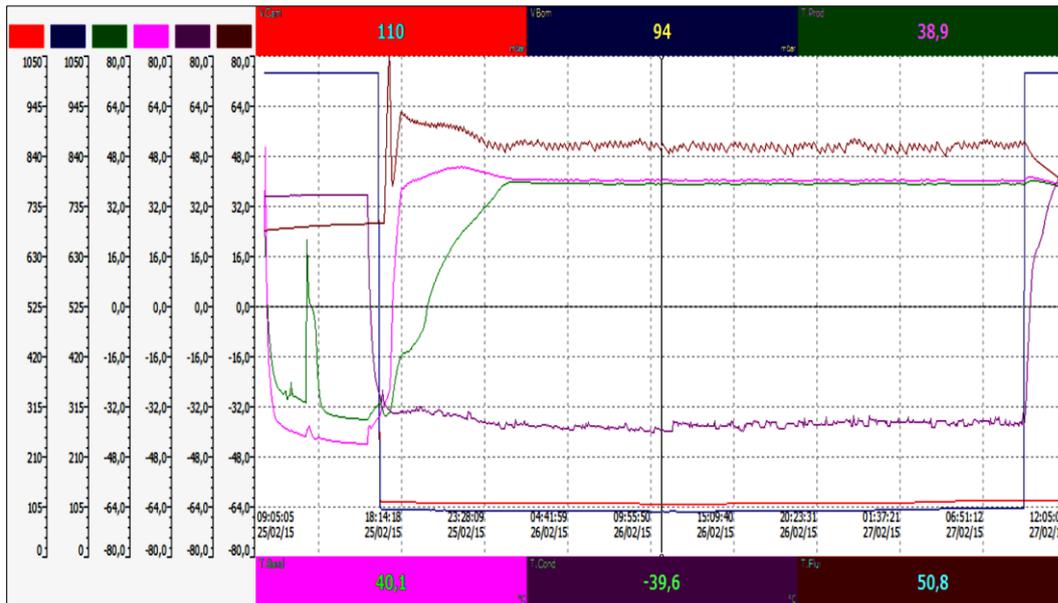


Fig. 34. Ciclo de liofilización aplicado a prueba de viabilidad de liofilización con CTZ al 1% (p/v), manitol al 2% (p/v) y PVP K30 al 5% (p/v) en alveolos de 1 ml de capacidad.

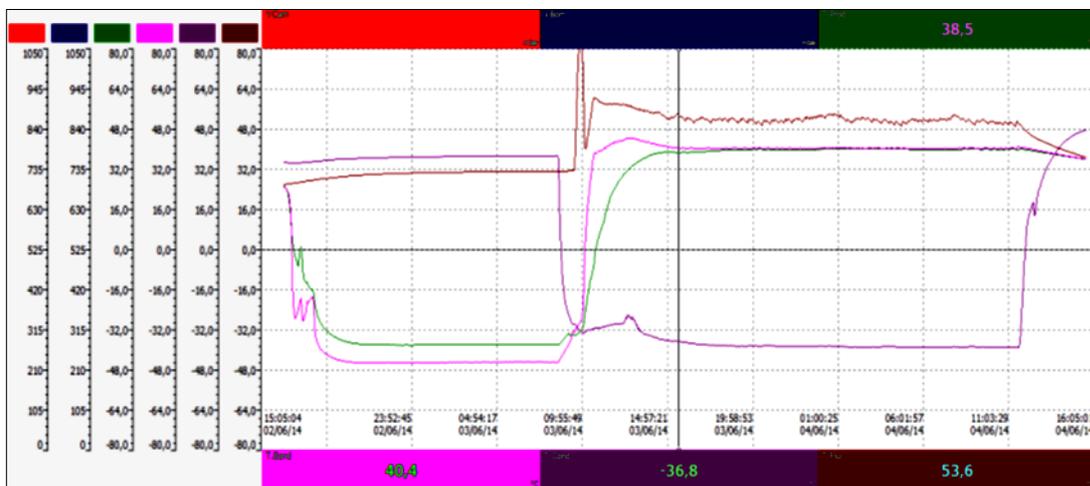


Fig. 35. Ciclo de liofilización aplicado a pruebas de viabilidad entre manitol al 2% (p/v), PVP K30 al 5% (p/v) y principio activo al 1% (p/v) con alveolos de 0,5 ml de capacidad.

Visto los resultados con alveolos de 1 ml de capacidad, se prueba la misma proporción de excipientes (2% manitol y 5% PVP K30 p/v) y se concentra el principio activo al 5% (p/v), para dosificar en alveolos redondos de 200  $\mu$ l de capacidad (200 $\mu$ l = 10 mg de CTZ)

con el objeto de reducir el tamaño del liofilizado. Los alveolos redondos de 200 $\mu$ l de capacidad median 10 mm de diámetro por 4 mm de altura. Se han obtenido liofilizados que presentaban grietas en su interior. De esta manera, se descartó este tamaño de alveolo y esta concentración de CTZ, observándose que la misma formulación no pudo expandirse adecuadamente dentro del mismo.

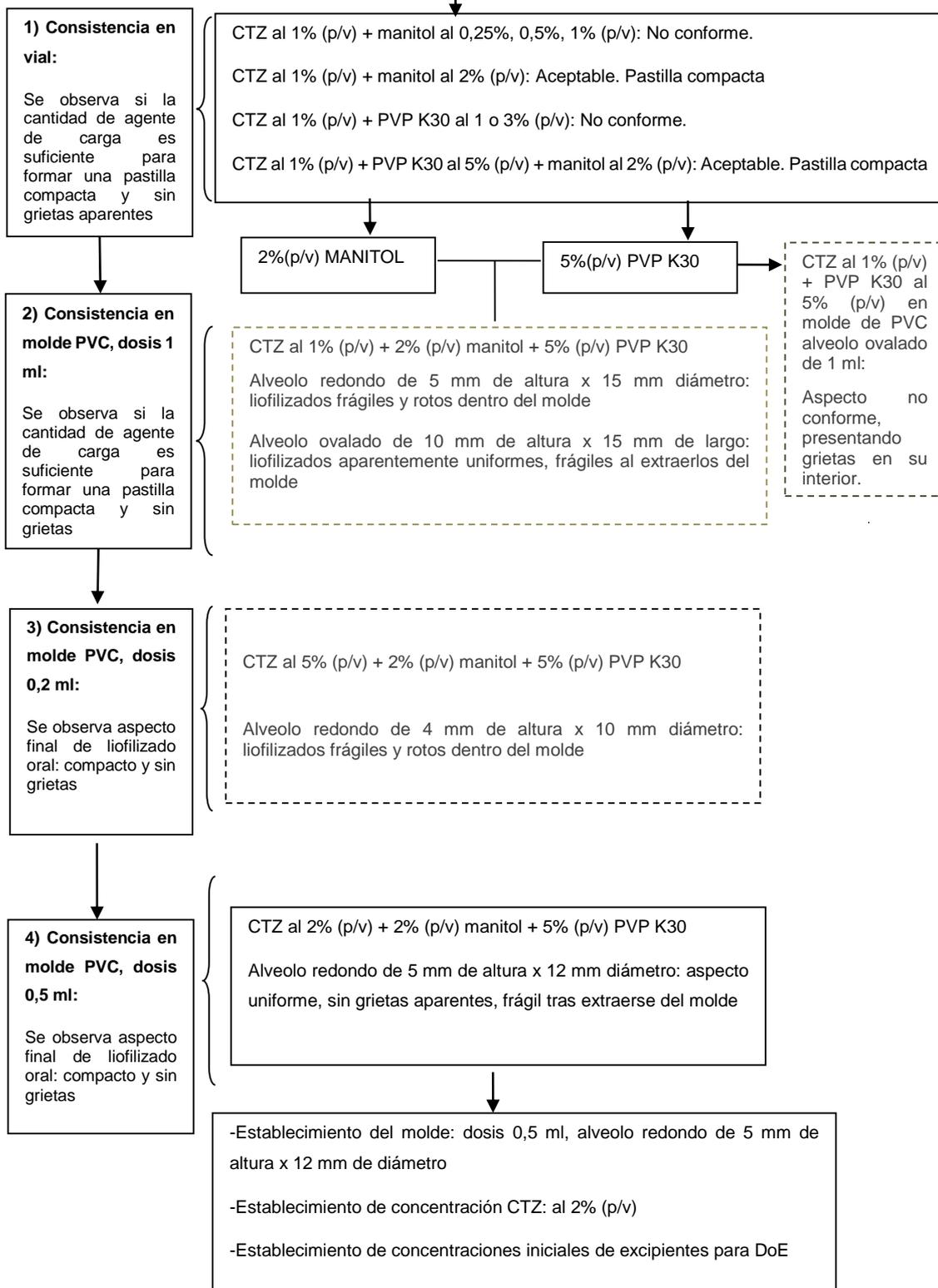
Se lleva a cabo una nueva prueba con moldes redondos 5 mm de altura y 12 mm de diámetro, con 0,5 ml de capacidad (una capacidad intermedia entre 1 ml y 200  $\mu$ l), manteniendo la misma concentración de excipientes (2% manitol, 5% PVP K30 p/v) y aumentando la concentración de CTZ al 2% (p/v) (igual a 20 mg/ml). Se obtuvieron liofilizados sin grietas aparentes en su interior y con una superficie uniforme.

Tras los ensayos con los distintos tamaños de alveolo, se ha podido establecer un tamaño de alveolo final en molde de PVC con una capacidad de 0,5 ml de solución, correspondiendo a 10 mg de CTZ (CTZ al 2% p/v), manteniendo las concentraciones de excipientes de manitol al 2% (p/v) y PVP K30 al 5% (p/v).



Fig. 36. Visualización de pruebas de liofilización: moldes de PVC redondos y ovalados con alveolos dosificados con solución de prueba y soluciones liofilizadas con misma dosis a distinto tamaño de alveolo en moldes de PVC con 2% manitol (p/v), 5% PVP K30 (p/v) y 1% CTZ (p/v), con la dosis 1 ml correspondiendo a 10 mg de CTZ.

**Pruebas de viabilidad de liofilización**  
**Establecimiento de concentraciones iniciales de excipientes,**  
**principio activo y dosis**



#### 5.4. DISEÑO FACTORIAL 3<sup>2</sup>: SOLUCIONES A, B, C, D, E, F, G, H, I

Tras los ensayos de viabilidad de liofilización con los dos excipientes, manitol y PVP K30, y desconociéndose a priori los resultados de un estudio del perfil calorimétrico diferencial de ambos por separado, del principio activo y de combinaciones entre ellos, se establecen tres concentraciones iniciales para cada excipiente, manteniéndose la concentración de CTZ de 20 mg/ml (equivalente a 2% (p/v) para una dosis de 0,5 ml/alveolo), para efectuar un diseño factorial 3<sup>2</sup> con el objetivo de encontrar la mejor combinación de excipientes con CTZ.

Son estos:

- Manitol: 2, 4,5 y 7% (p/v)

Para el excipiente manitol, se prueba con la concentración inicial al 2% (p/v) y concentraciones de 4,5 y 7 % (p/v), con el objetivo de verificar la mejor cantidad manitol que genere una estructura de soporte efectiva, sin afectar la estabilidad de la fórmula, pese a conocerse la posibilidad de generar formas metaestables de este excipiente.

- PVP K30: 1, 3 y 5%

Pese a que en las pruebas de viabilidad de liofilización las concentraciones al 1% y al 3% (p/v) no habían generado pastillas compactas en vial, y conociendo el perfil higroscópico del PVP K30, se decide volver a estudiar dichas concentraciones, con el objeto de verificar si se podrían tener en cuenta para conseguir un liofilizado estable con manitol a distintas concentraciones, no solo con manitol al 2% (p/v), como también con manitol al 4,5% (p/v) y 7% (p/v).

Como criterio del diseño factorial 3<sup>2</sup> se estableció excluir las combinaciones que presentaran formas metaestables (ausencia/presencia de formas metaestables).

Antes de empezar el diseño factorial, se han estudiado las tres concentraciones propuestas de excipientes y de principio activo por separado, para detectar si los excipientes y el principio activo presentaban formas metaestables, y luego comparar los resultados de las combinaciones entre ellos y con el principio activo.

#### 5.4.1. Perfil calorimétrico diferencial de los excipientes y del principio activo

Primeramente se llevó a cabo un estudio del perfil calorimétrico de las tres concentraciones de manitol y PVP K30 propuestas para verificar la presencia y/o ausencia de formas metaestables de cada concentración por separado, además de la concentración utilizada para el principio activo.

Para todas las concentraciones de PVP K30 estudiadas, no se detectaron formas metaestables, mientras que lo contrario ha ocurrido con las concentraciones de manitol.

El principio activo no presentó formas metaestables.

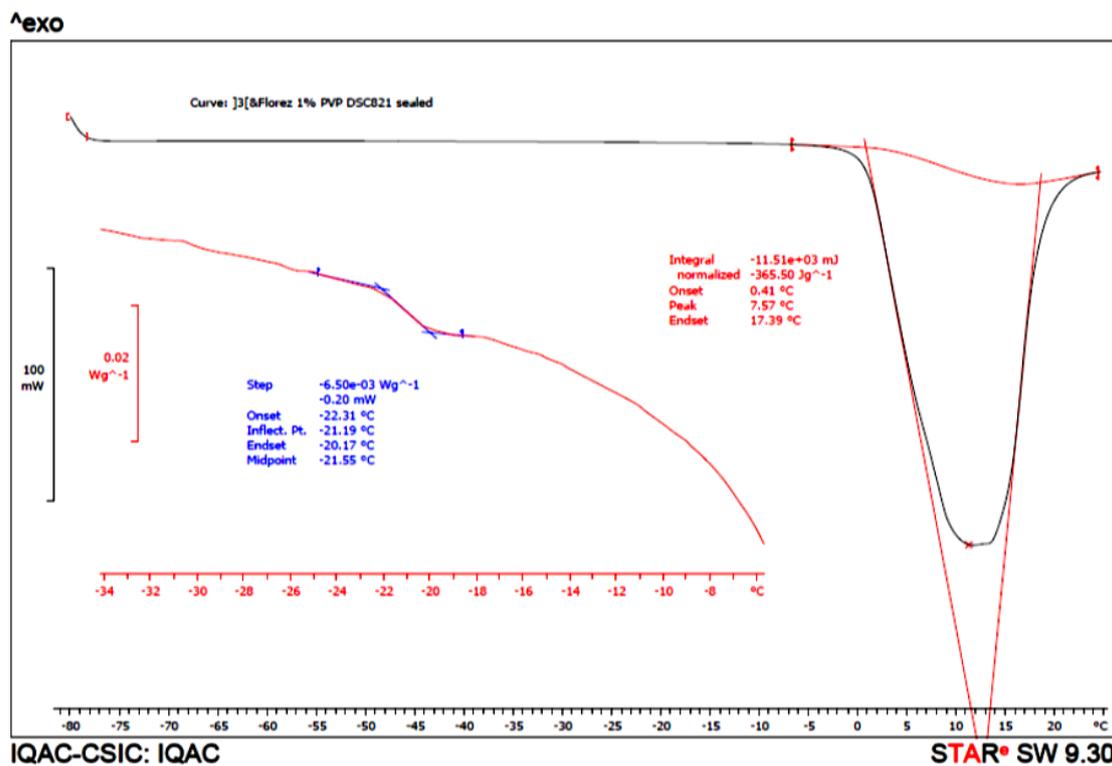


Fig. 37. Perfil calorimétrico de una solución al 1% PVP K30 (p/v). Se observa ausencia de formas metaestables, y una Tg' de aproximadamente -22,3 °C.

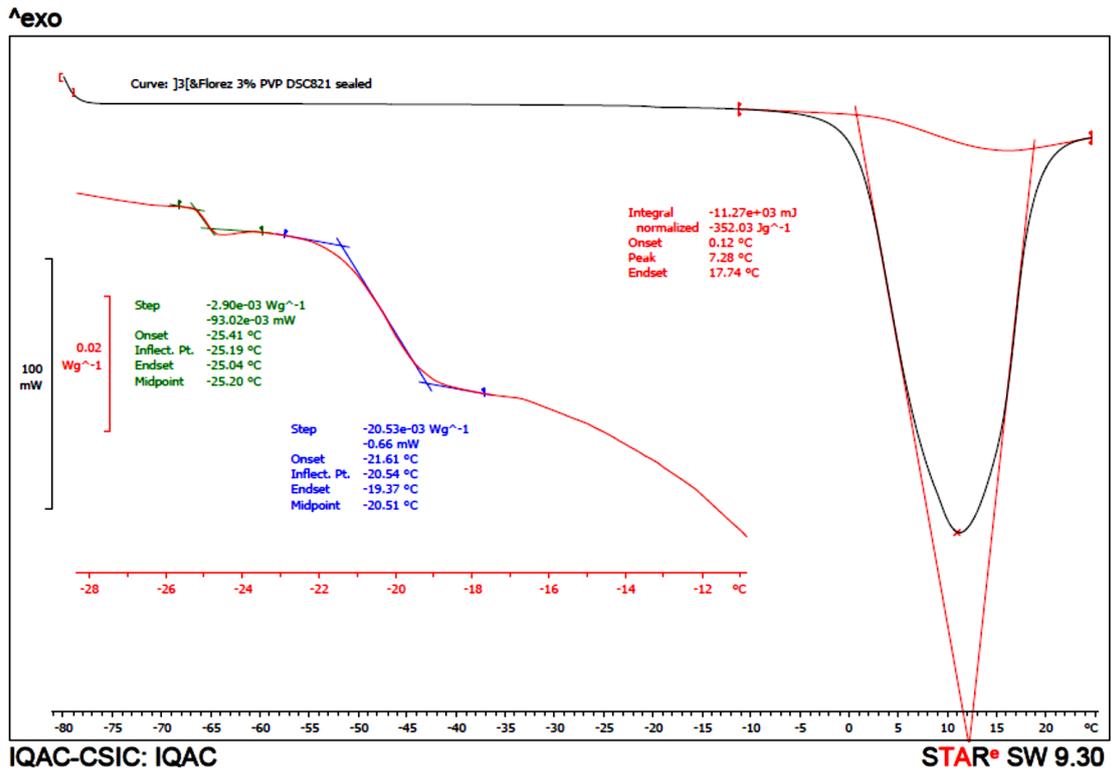


Fig.38. Perfil calorimétrico de PVP K30 al 3% (p/v).

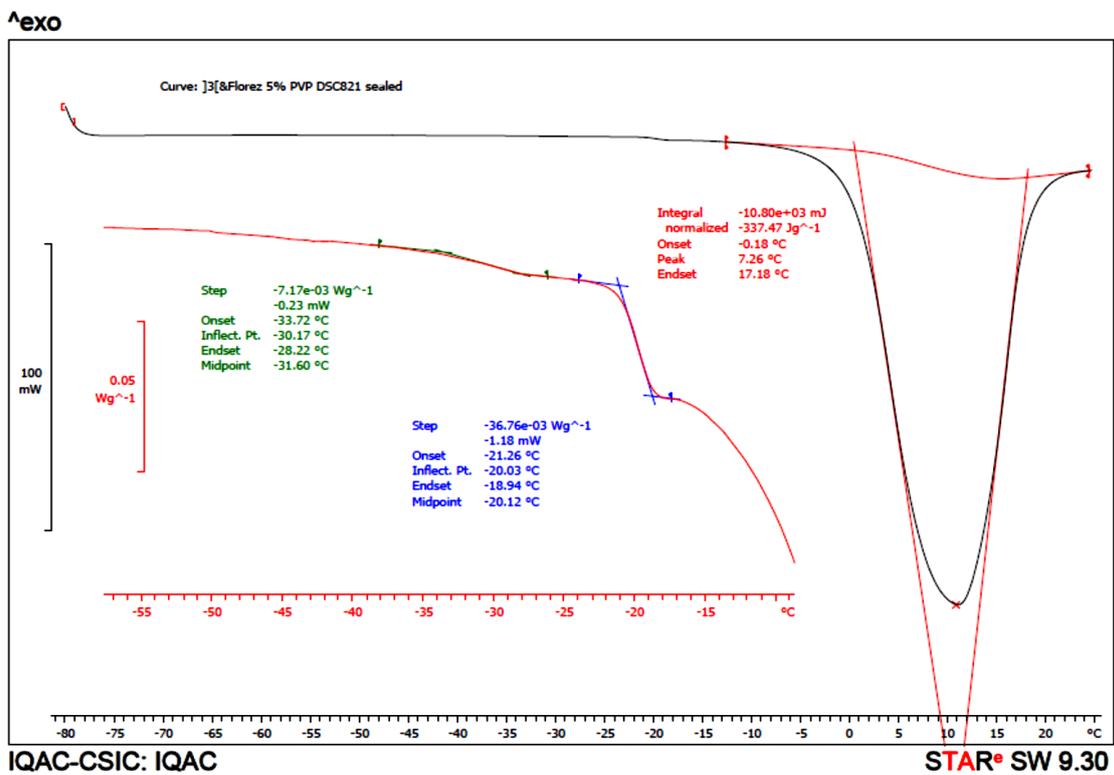


Fig. 39. Perfil calorimétrico de PVP K30 al 5% (p/v).

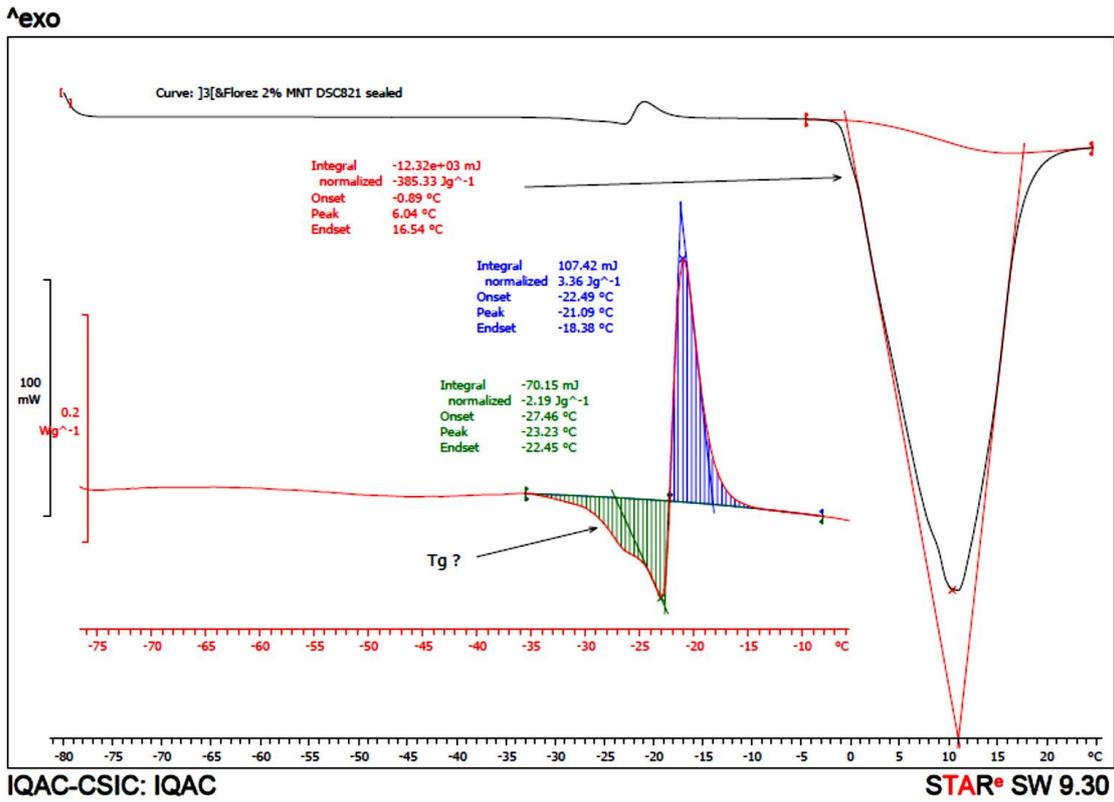


Fig. 40. Perfil calorimétrico de manitol al 2% (p/v).

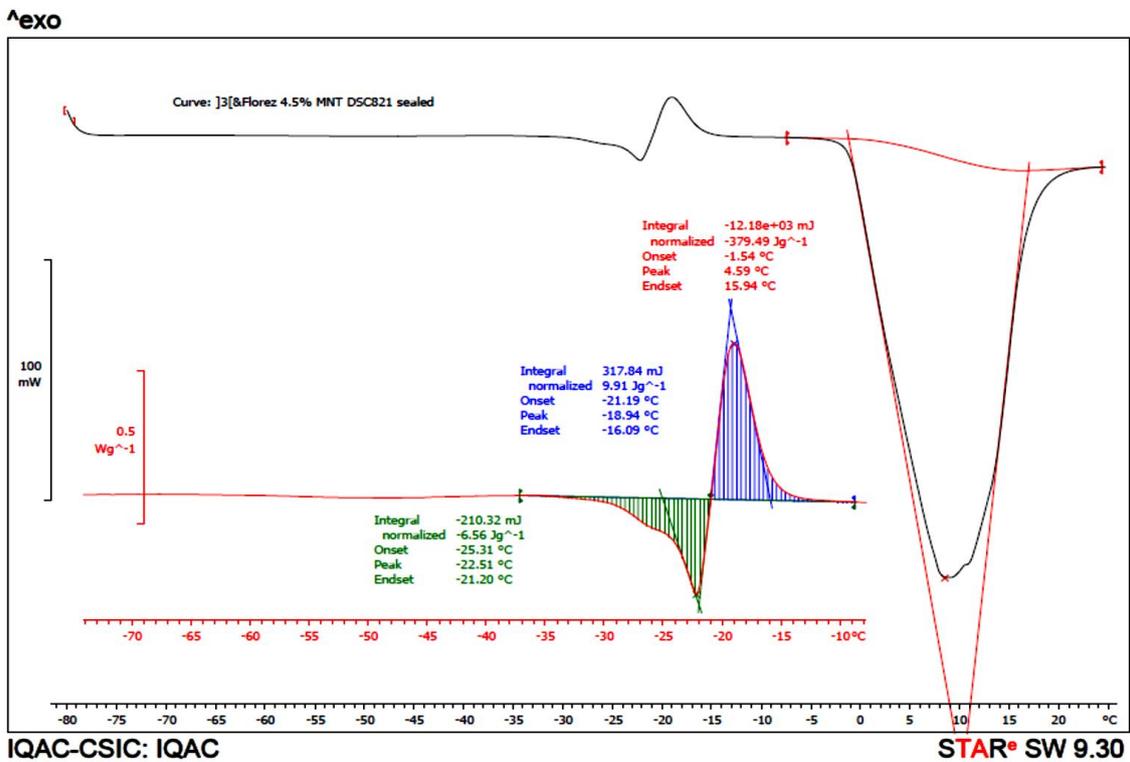


Fig. 41. Perfil calorimétrico de manitol al 4,5% (p/v).

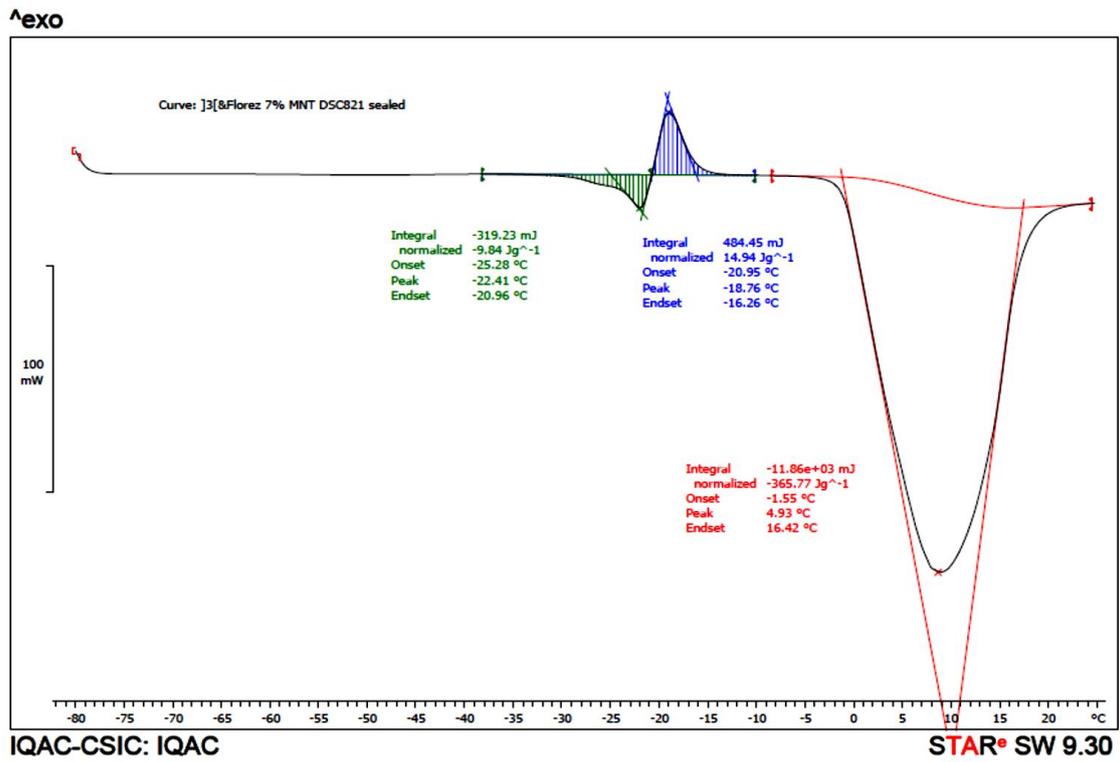


Fig. 42. Perfil calorimétrico de manitol al 7% (p/v).

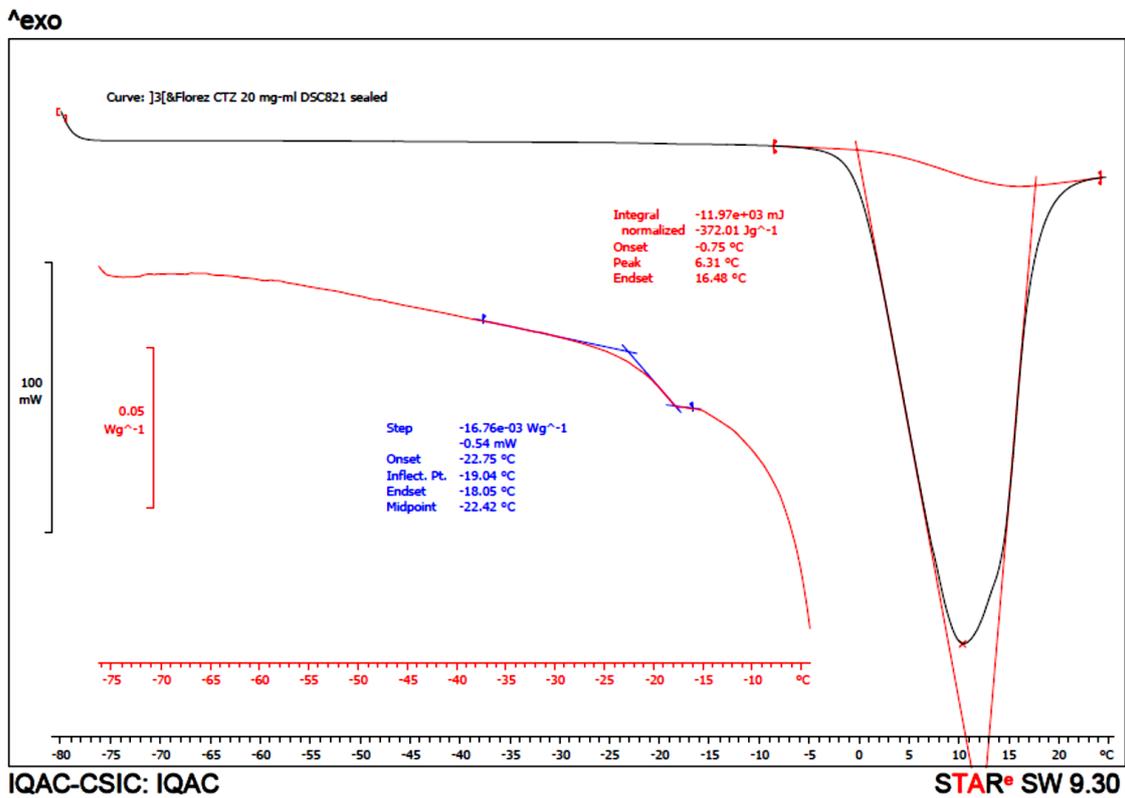


Fig. 43. Perfil calorimétrico de CTZ a 20 mg/ml.

### 5.4.2. Perfil calorimétrico diferencial de las soluciones del diseño factorial 3<sup>2</sup>

Se prepararon nueve soluciones, y a cada una se le denominó con una letra del alfabeto: A, B, C, D, E, F, G, H, I. Las soluciones se obtuvieron mediante disolución en agua destilada de CTZ a una concentración al 2% (p/v), y combinaciones entre manitol al 2, 4,5 y 7% (p/v) y PVP K30 al 1, 3 y 5% (p/v). Con la técnica DSC se consiguieron los perfiles calorimétricos y la Tg', mientras que mediante la técnica FDM se obtuvieron los resultados de Tc para las nueve fórmulas del diseño factorial 3<sup>2</sup>. La técnica FDM se considera complementar al DSC por la obtención de los valores de Tc y las fotografías del proceso de liofilización.

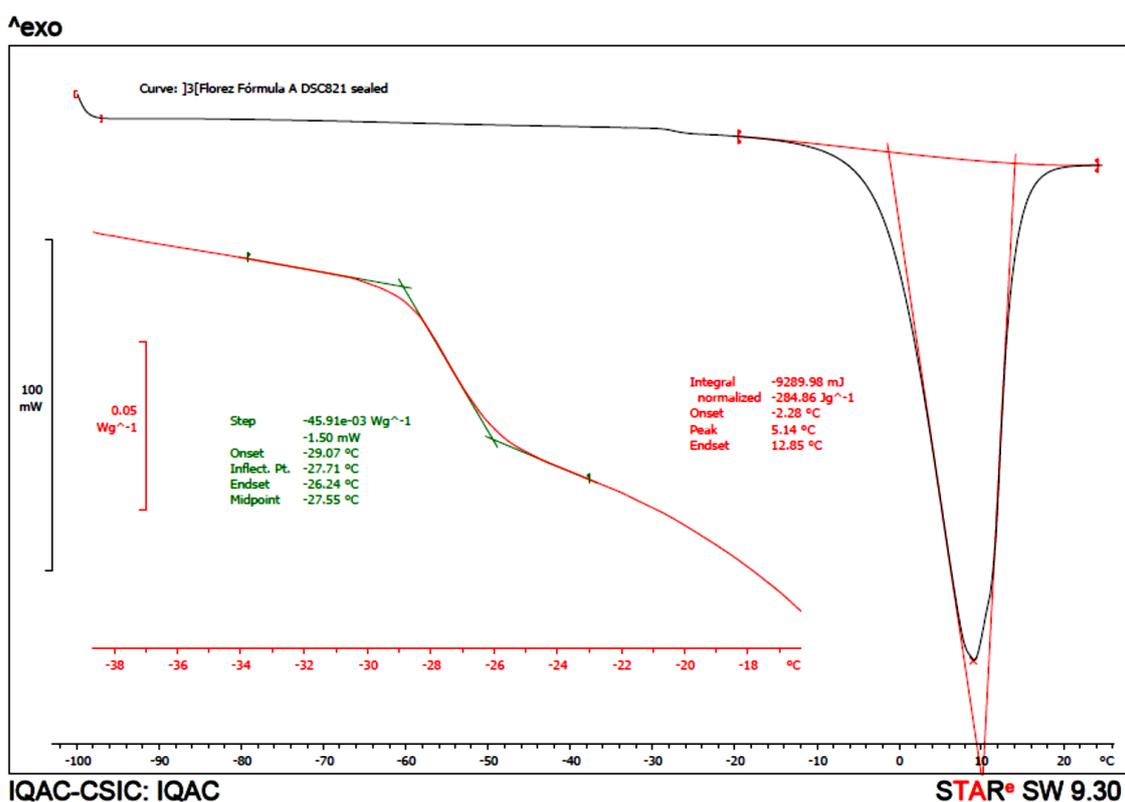


Fig. 44. Perfil calorimétrico de fórmula A.

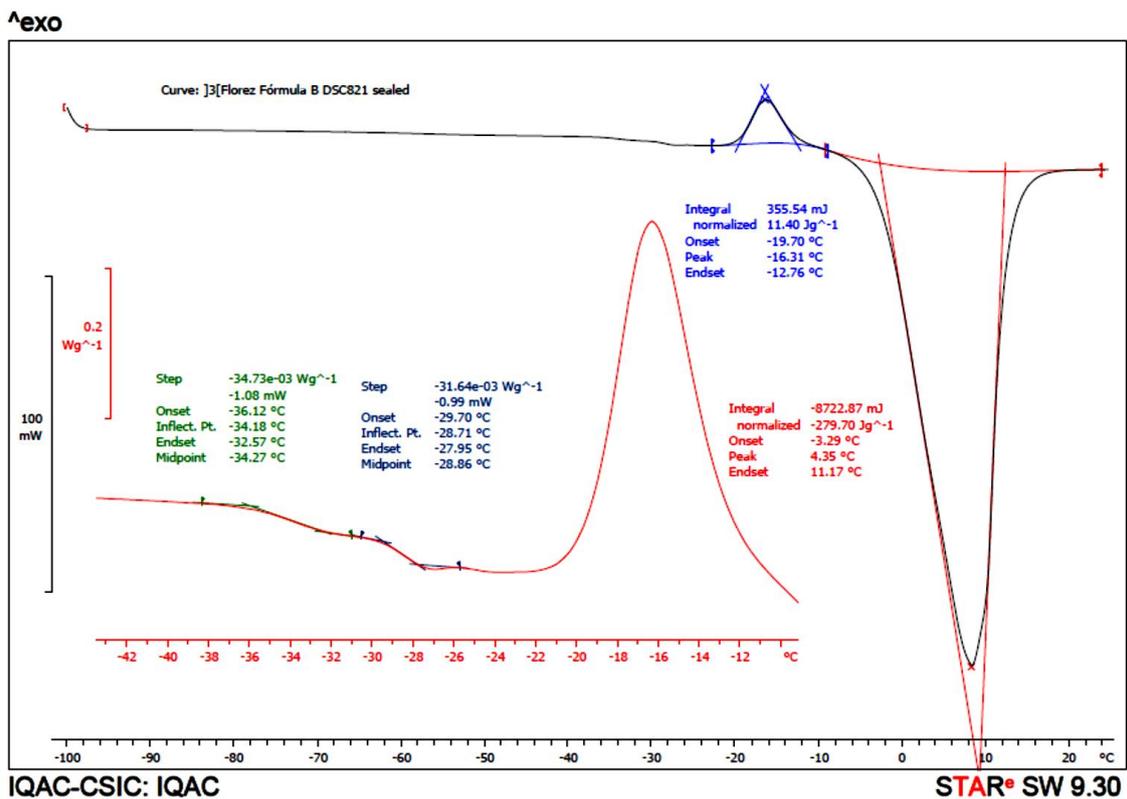


Fig. 45. Perfil calorimétrico de fórmula B.

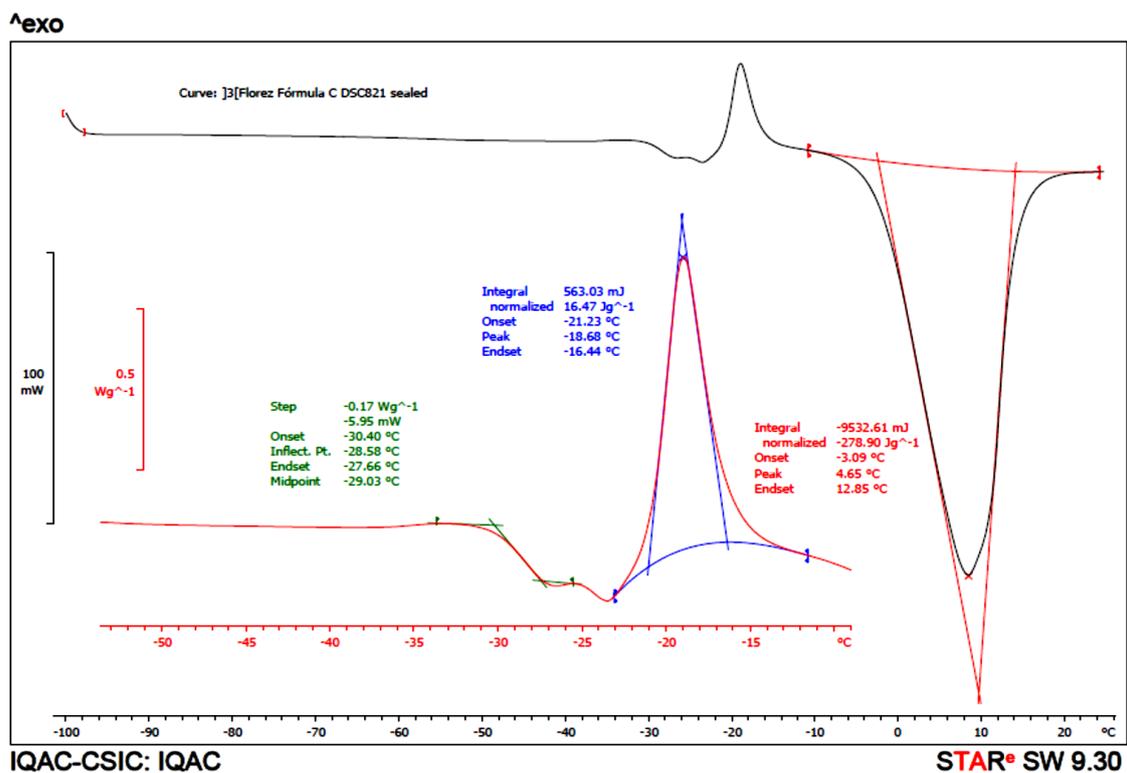


Fig. 46. Perfil calorimétrico de fórmula C.

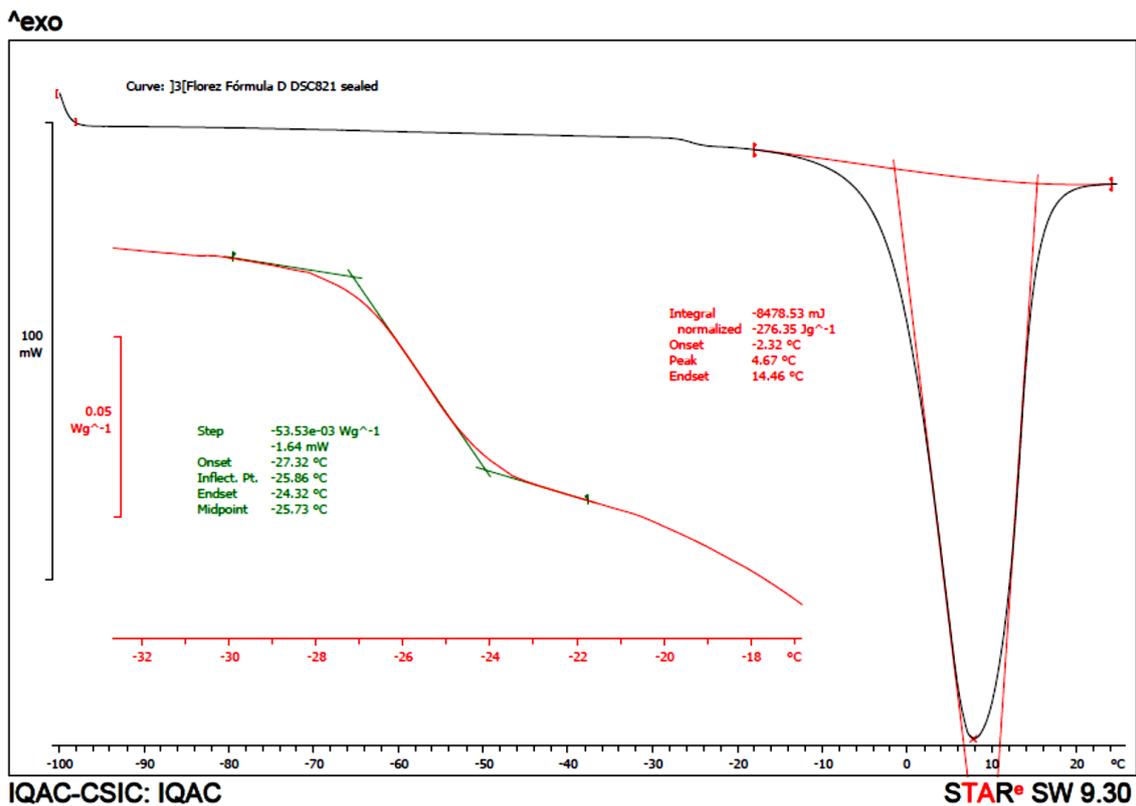


Fig. 47. Perfil calorimétrico de fórmula D.

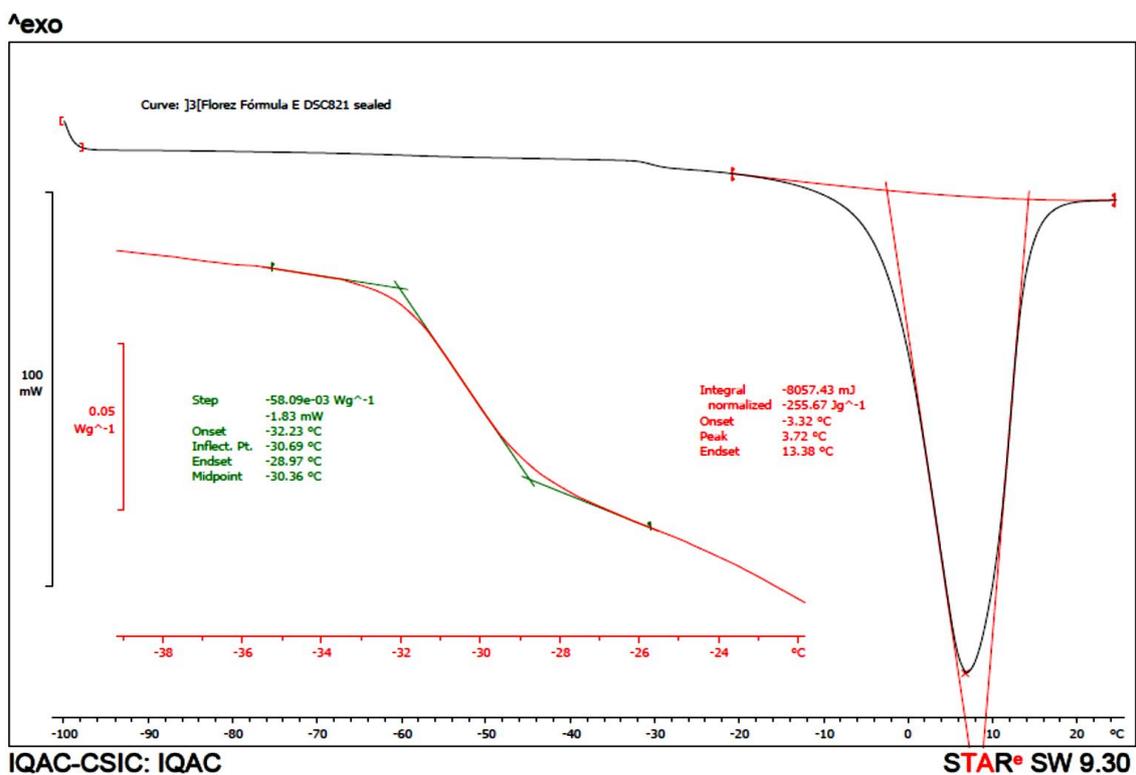


Fig. 48. Perfil calorimétrico de fórmula E.

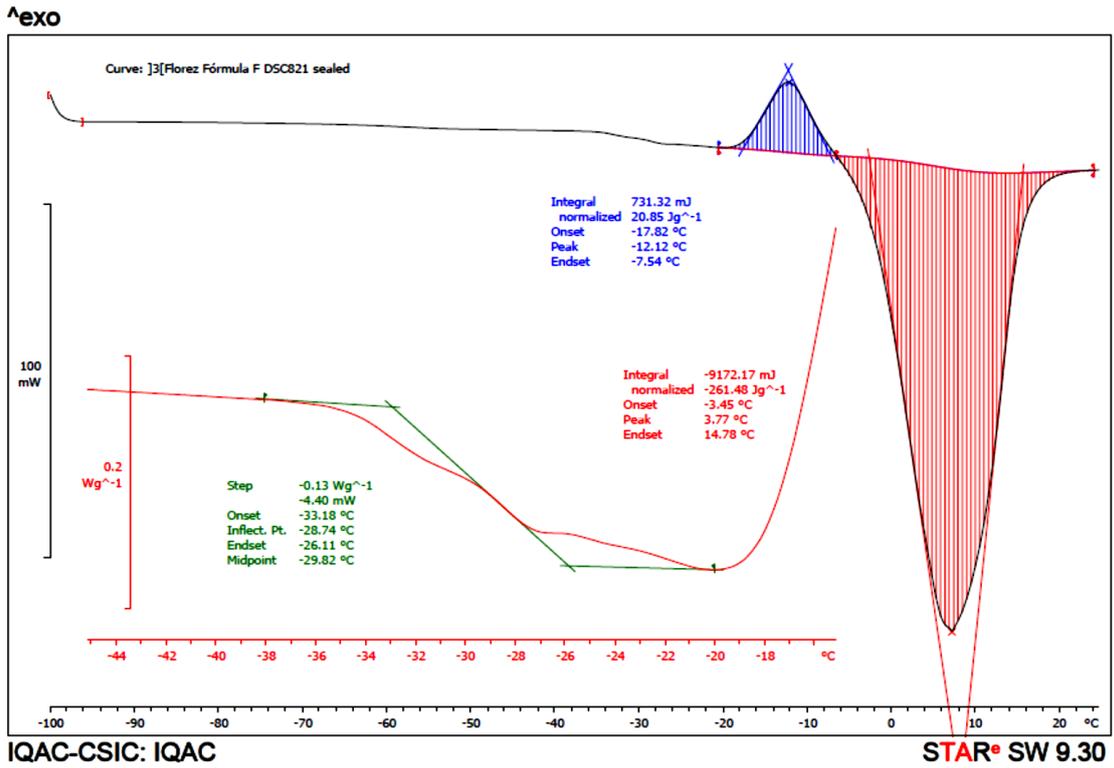


Fig. 49. Perfil calorimétrico de fórmula F.

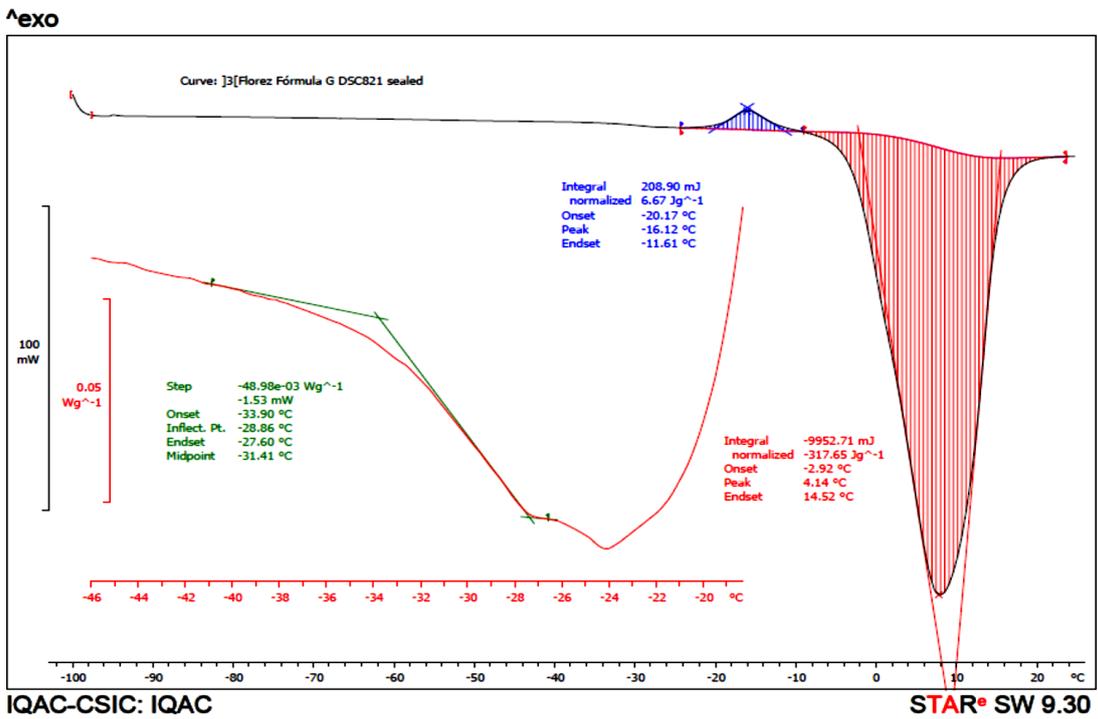


Fig. 50. Perfil calorimétrico de fórmula G.

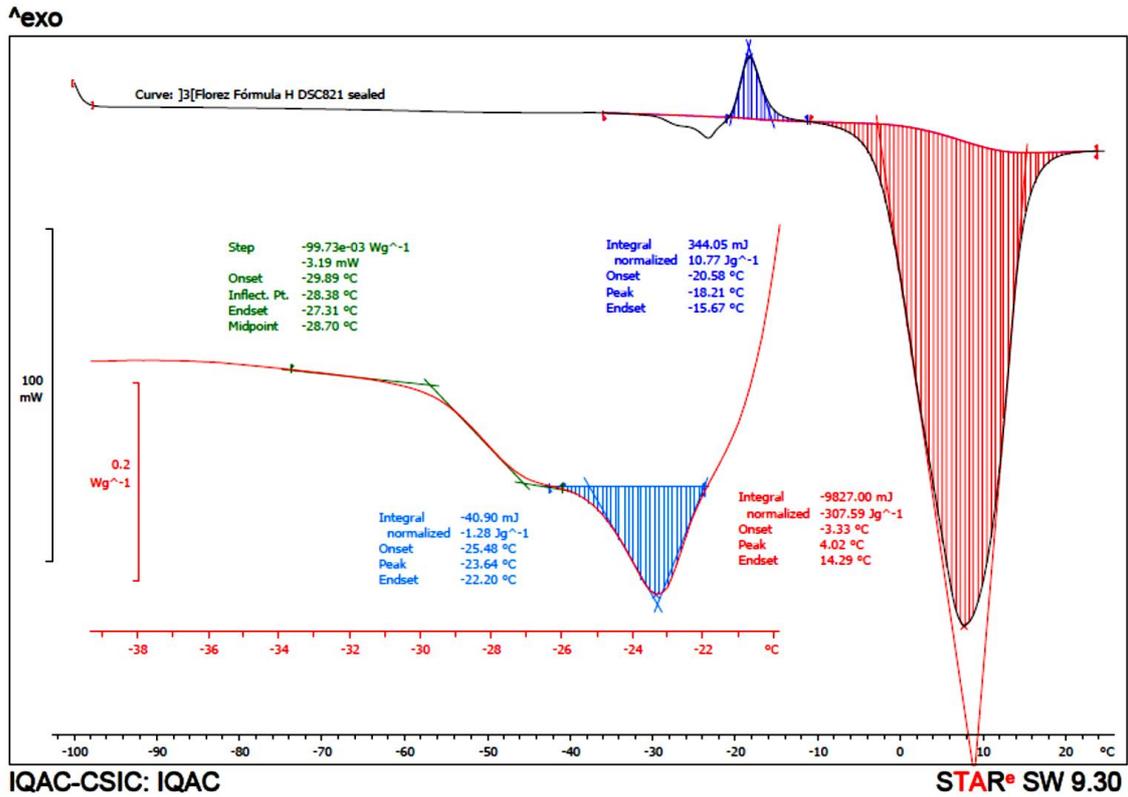


Fig. 51. Perfil calorimétrico de fórmula H.

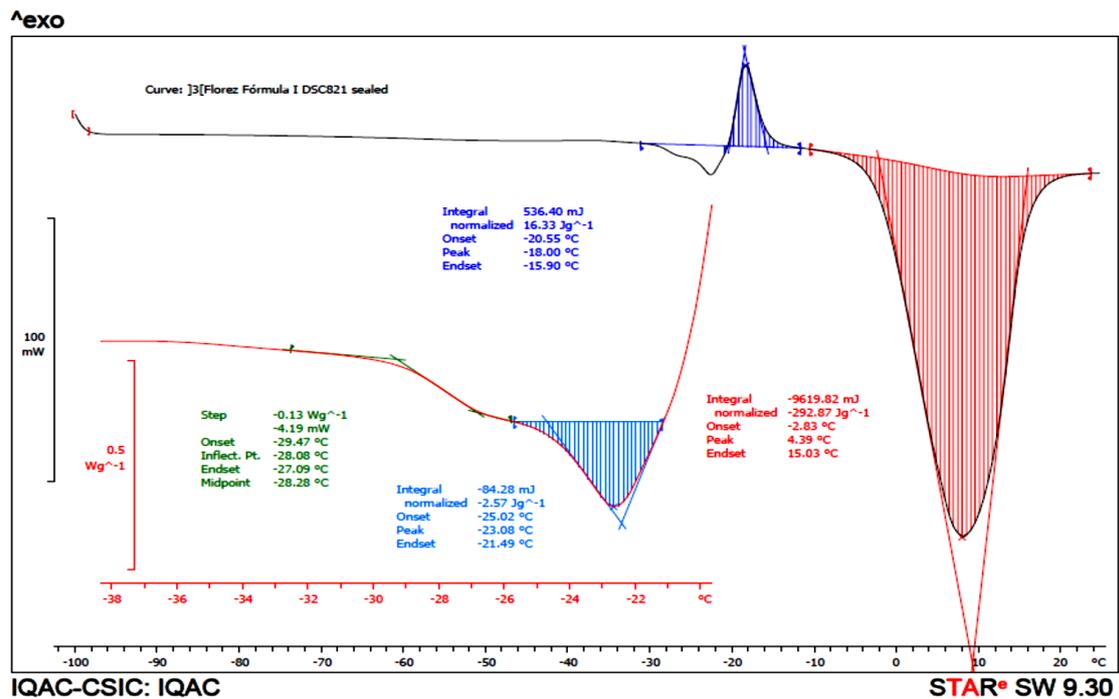


Fig. 52. Perfil calorimétrico de fórmula I.

#### 5.4.3. Microscopía de Liofilización (Freeze drying Microscopy, FDM)

En el intento de liofilizar un producto de características amorfas, se puede producir el fenómeno del colapso. Ocurre durante el secado primario debido a la resistencia de la masa seca que dificulta la salida de vapores, lo que provoca un aumento de la presión en el frente de sublimación, y en consecuencia, el colapso de la masa seca. Es decir, durante la sublimación del hielo (secado primario) la fase vítrea remanente debería soportar su propio peso. Por encima de la  $T_g'$ , se observa que la viscosidad se reduce hasta que la fase vítrea se fluidifica, perdiendo su rigidez estructural y provocando el colapso (desmoronamiento) del producto. A la temperatura en que el colapso ocurre se le denomina  $T_c$ , temperatura de colapso.

La técnica de FDM proporciona la temperatura de congelación de las soluciones y la temperatura de colapso ( $T_c$ ) para cada una de las soluciones estudiadas.

Se ha observado que las formulaciones A y D parecen ser las más óptimas debido a presentar  $T_c$  entre  $-29\text{ °C}$  y  $-31,2\text{ °C}$ .

Considerando que mediante técnica DSC es posible encontrar las fórmulas sin formas metaestables, se decide incluir los resultados de FDM de la fórmula E (ver Fig. 55). No obstante, según el informe de FDM no se considera como una fórmula óptima por presentar una  $T_c$  de alrededor de entre  $-31,9\text{ °C}$  a  $-30,2\text{ °C}$ , con una presión de 1 mbar, que se ha considerado muy alta para el proceso de liofilización.

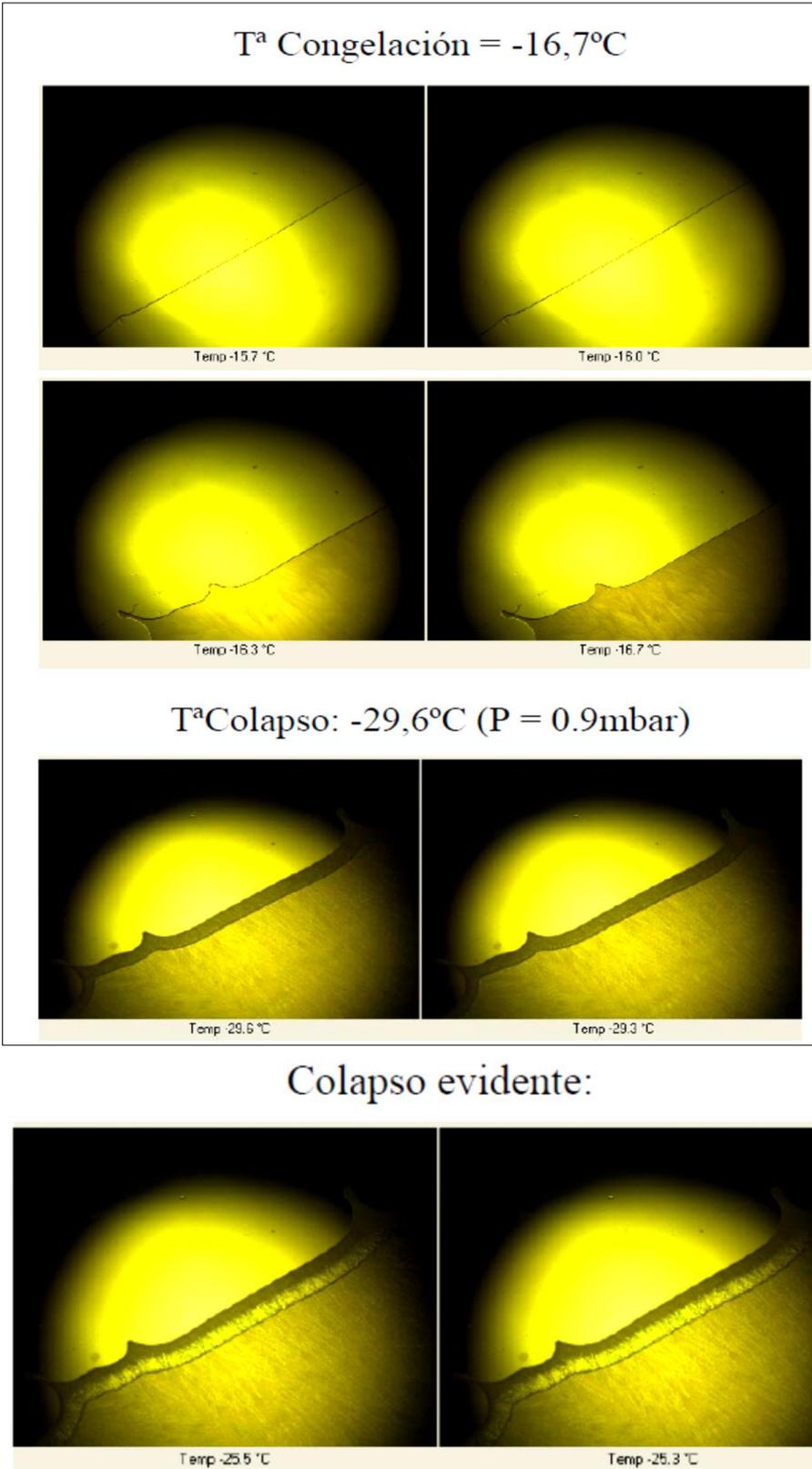


Fig. 53. FDM de fórmula A.

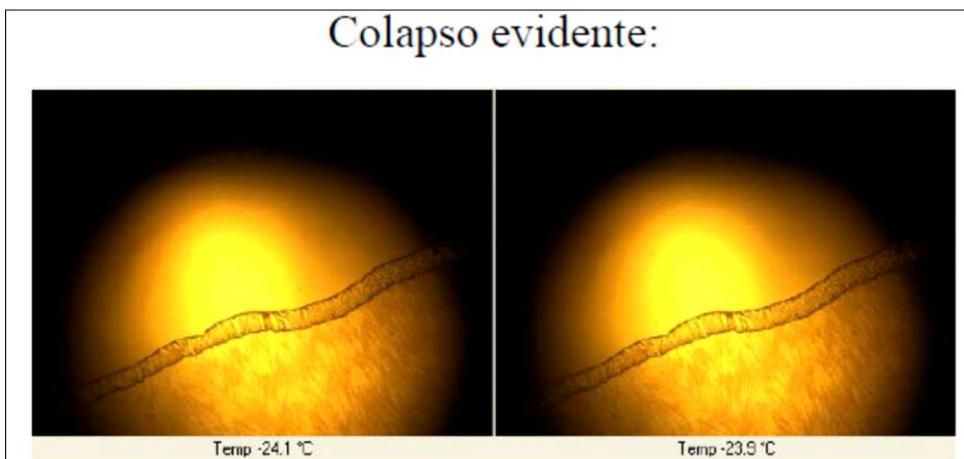
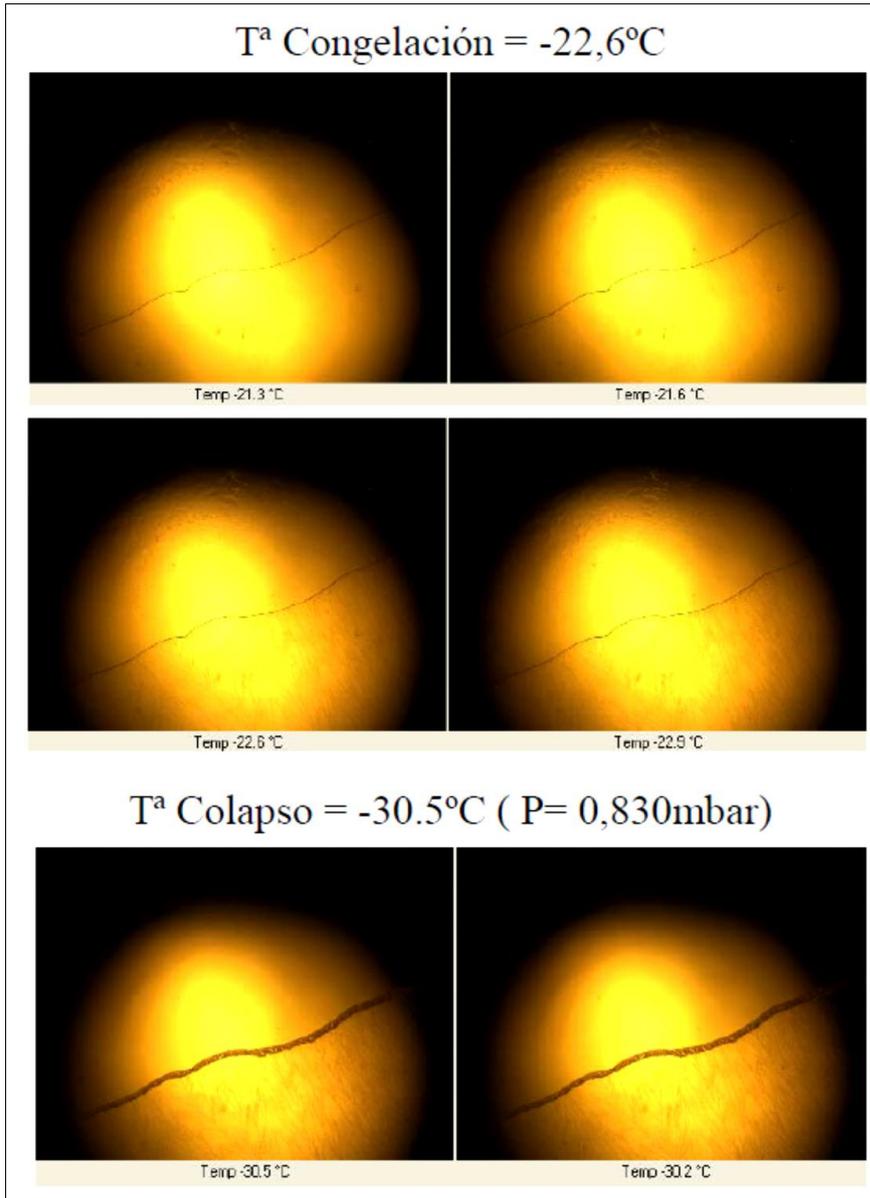


Fig. 54. FDM de fórmula D.

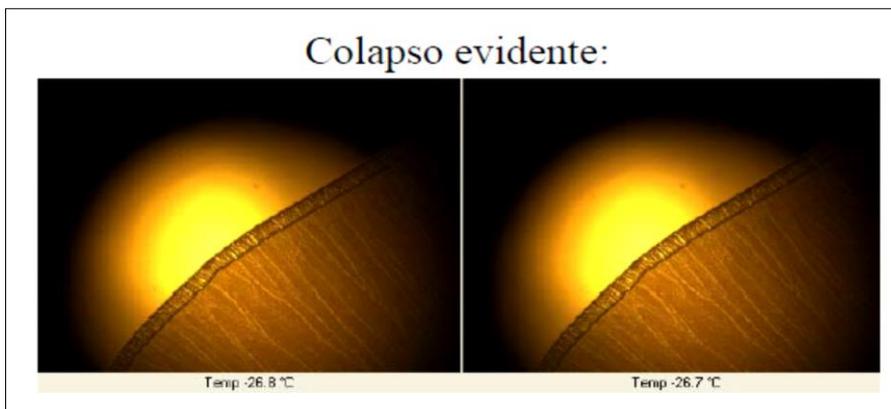
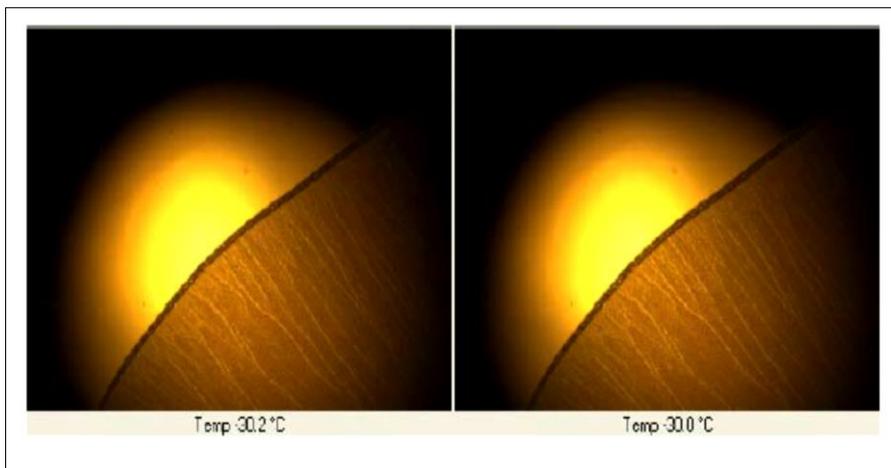
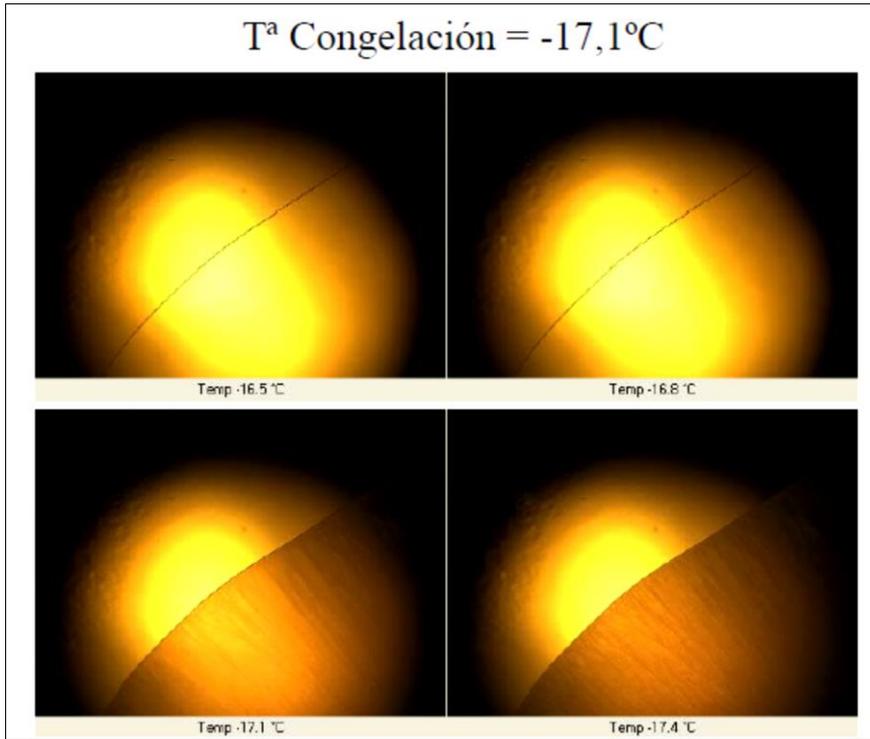


Fig. 55. FDM de fórmula E.  $T_c$   $-30,2^{\circ}\text{C}$ , con Presión 1 mbar.

Las soluciones B, C, F, G, H e I, descartadas por sus resultados de DSC, presentan una mayor concentración de manitol que de PVP K30, mientras que las soluciones A, D y E presentan una mayor concentración de PVP K30 que de manitol, siendo la solución E la que presenta proporciones más aproximadas de ambos excipientes. Abajo se enseña el resultado del análisis FDM para solución F.

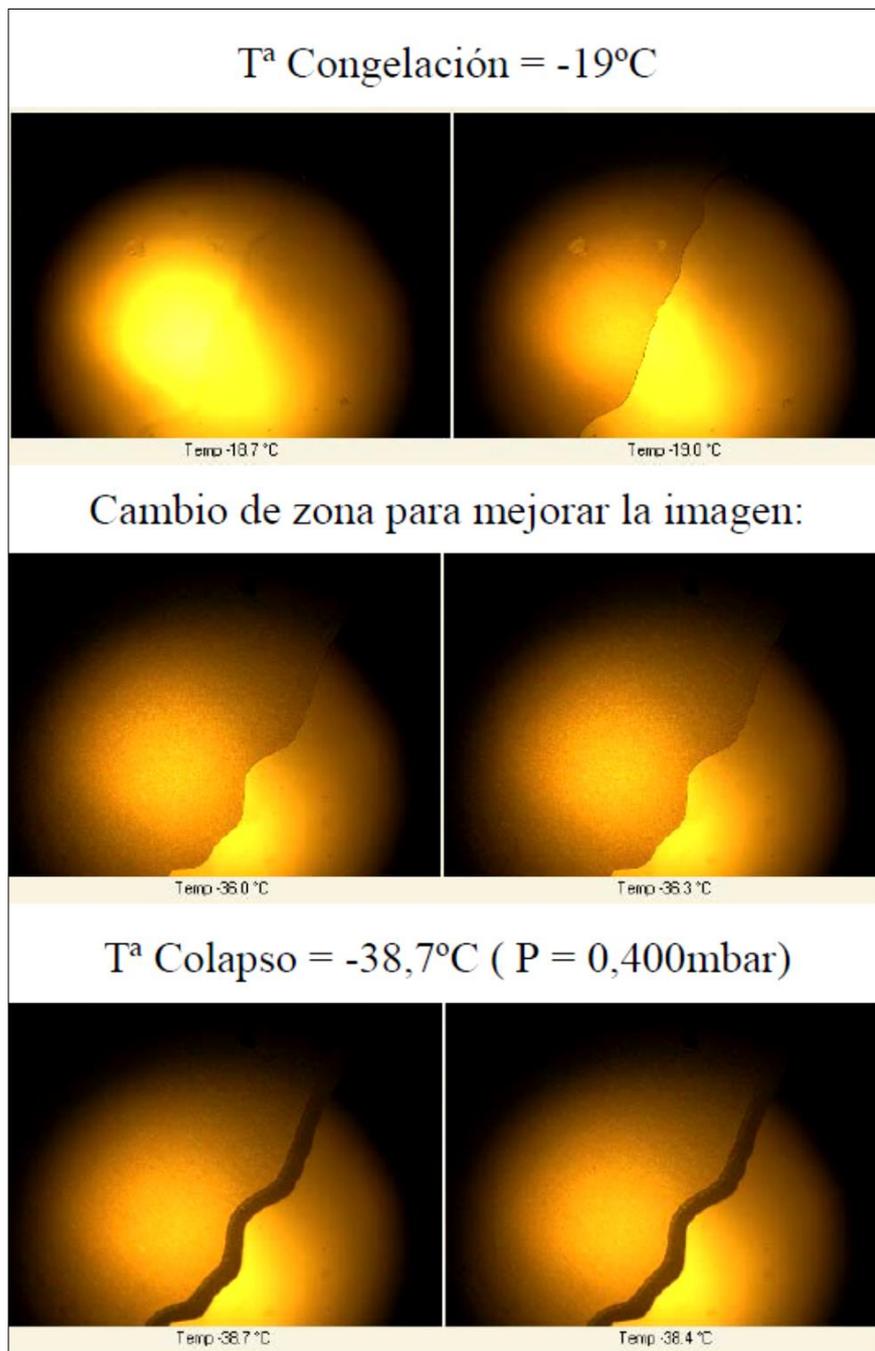


Fig. 56. FDM de fórmula F.

Tabla 10. Diseño factorial 3<sup>2</sup>: resultados DSC y FDM y selección para prueba de liofilización

Solución	Manitol (%)	PVP K30 (%)	Formas metaestables (Ausencia/Presencia)	Tg' °C (DSC)	Tc °C (FDM)	Seleccionado para prueba de liofilización (Sí/No)
A	2	3	Ausencia	-29,1	-29,3	Sí
B	4,5	3	Presencia	-36,0	-34,4	No
C	7	3	Presencia	-30,4	-29,0	No
D	2	5	Ausencia	-27,3	-31,0	Sí
E	4,5	5	Ausencia	-32,2	-31,0	Sí
F	7	5	Presencia	-33,2	-39,0	No
G	2	1	Presencia	-34,0	-35,0	No
H	4,5	1	Presencia	-29,9	-24,7	No
I	7	1	Presencia	-29,5	-35,0	No

#### 5.4.4. Estudio de viabilidad de liofilización con soluciones A, D y E

Tras verificar que las soluciones A, D y E no presentaron formas metaestables, el siguiente paso ha sido el de efectuar pruebas de viabilidad de liofilización de dichas fórmulas. De ese modo, se ha verificado:

- el aspecto final del LO (agrietado, no agrietado)
- la resistencia mecánica del LO generado al extraerlo del molde de PVC

De esa manera, las tres soluciones/fórmulas (A, D y E) se liofilizaron en moldes de PVC con alveolos redondos con 12 mm de diámetro y 5 mm de altura, con 0,5 ml de capacidad. Se concentró la solución de CTZ al 2% (p/v), para que 0,5 ml de solución correspondiera a 10 mg de principio activo.

Tras el ciclo de liofilización todos los liofilizados no presentaron una estructura resistente al extraerse del molde. La solución A presentaba grietas en su interior, un color blanco translúcido y se rompía fácilmente al extraerse del molde. La solución D presentó un aspecto agrietado, blanco translúcido, con facilidad de romperse al extraerse del molde, de manera similar a la combinación A. La solución E presentaba grietas en los bordes, con algunas unidades liofilizadas con grietas en su interior, pero el aspecto era más compacto y presentaba un color blanco no translúcido. Solamente la solución E presentó mayor resistencia a rotura al extraerse del alveolo del molde de PVC (solución con mayor cantidad de agente de carga de los tres ensayados). Tras verificarse los resultados del análisis factorial por DSC ( $3^2$ ) y de la prueba de viabilidad de liofilización, a partir de la solución E se generaron tres soluciones: E1, E2 y E3.

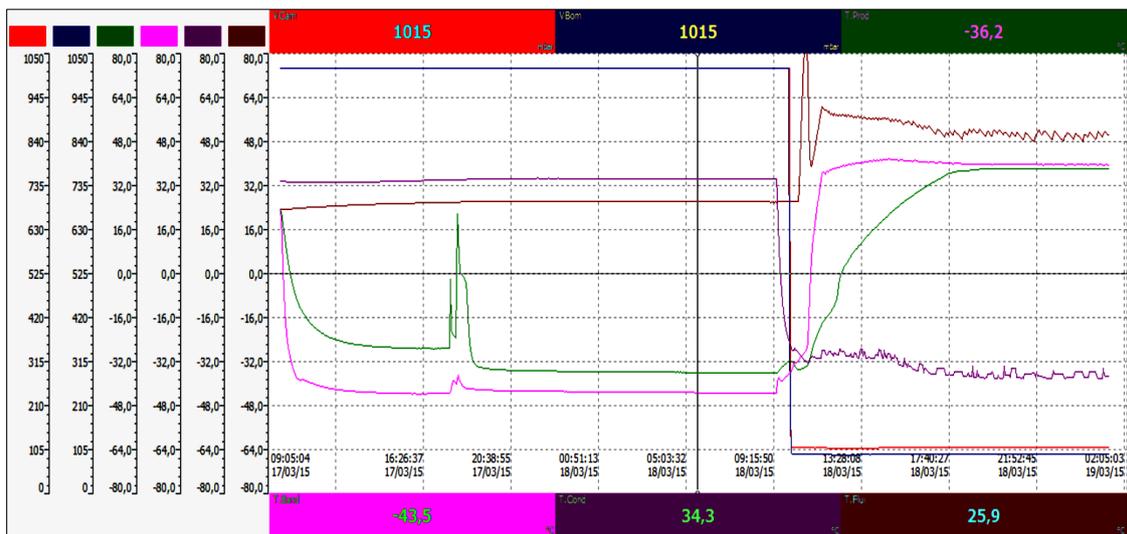


Fig. 57. Ciclo de liofilización para soluciones A, D y E.

### 5.5. LIOFILIZADOS ORALES E1, E2 Y E3

Se prepararon dos soluciones, todas con 4,5% de manitol y cantidades crecientes de PVP K30: E1 con 7% (p/v) y E2 con 10% (p/v) para a efectuar un estudio de viabilidad de liofilización. Se observa que el liofilizado obtenido de la solución E1 presenta facilidad de rotura en la extracción del molde de PVC, mientras que el liofilizado obtenido de la solución E2 se desprende fácilmente del molde y no presenta rotura fácil. A partir de verificar el aspecto de los liofilizados E1 y E2, se preparó un liofilizado denominado E3,

con 4,5% manitol y 8,5% de PVP K30. El liofilizado E3 presenta facilidad en la extracción del molde y, tal como el E2, no se rompió tras extracción del molde.

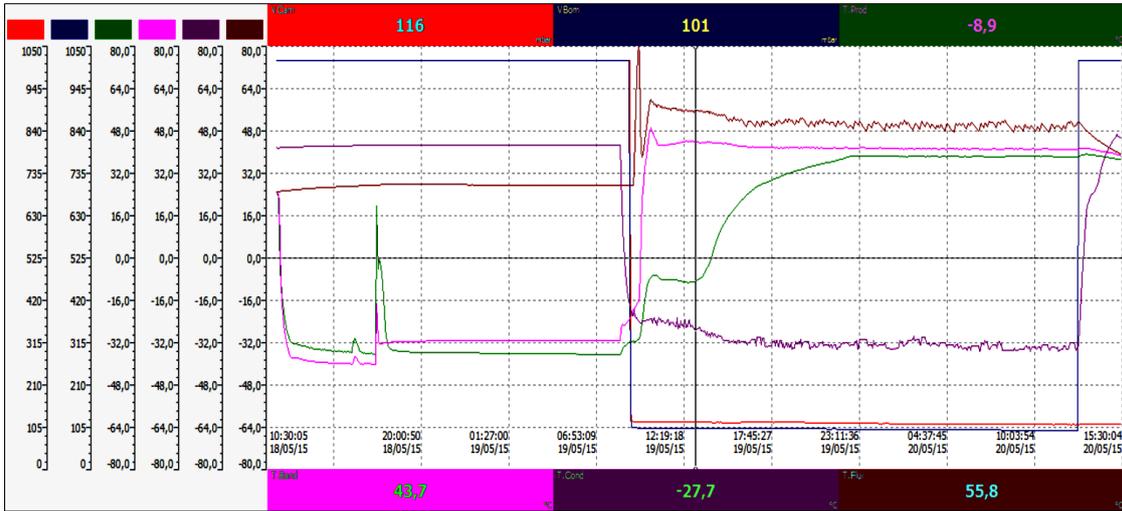


Fig. 58. Ciclo de liofilización de prueba de E1, E2

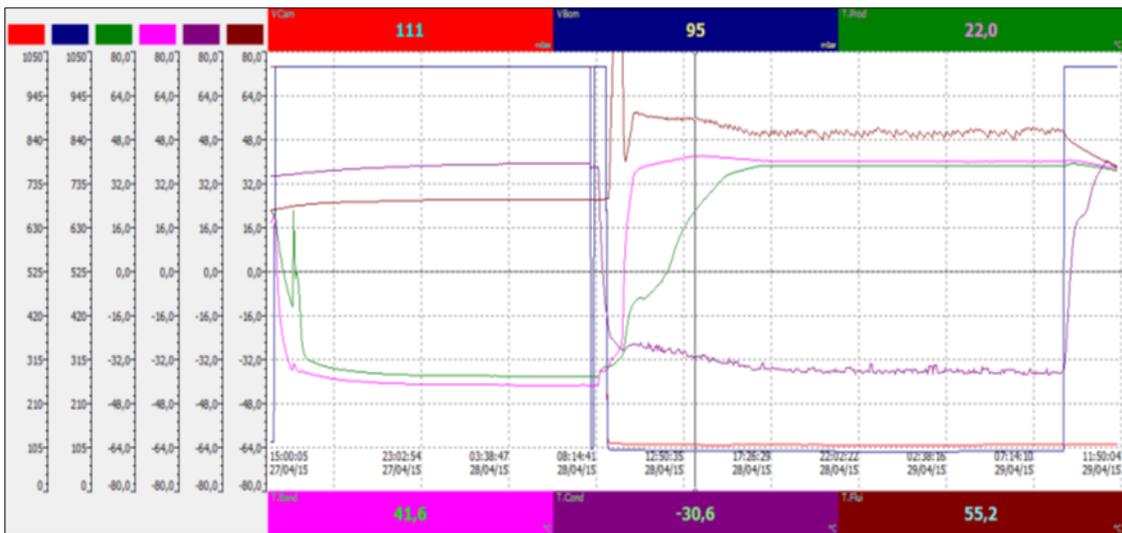


Fig. 59. Ciclo de liofilización de prueba de E1, E2 y E3.

## 5.6. ENMASCARAMIENTO DEL SABOR AMARGO

El principio activo CTZ presenta un sabor característicamente amargo. Para facilitar la administración del LO, es necesario añadir excipientes para enmascarar su sabor amargo. Para ello, el 4,5% (p/v) de manitol presente en la solución no ha sido suficiente. Siendo así, se ha añadido a la fórmula un 0,1% del edulcorante sucralosa, 0,1% de glicirricinato amónico y un 0,1% de esencia de menta piperita Ph. Eur (p/v). La sucralosa es un edulcorante sintético derivado de la sacarosa. Es soluble en agua y presenta una intensidad de dulzor de 400-1000 veces mayor que la sacarosa, sin presentar sabor metálico o notas amargas (77). Además, se ha añadido un 0,1% de glicirricinato amónico, que puede presentar una intensidad de dulzor de hasta 50 veces superior a la de la sacarosa, y que se utiliza en combinación con saborizantes para enmascarar sabores amargos (78). Como saborizante se ha añadido un 0,1% de esencia de menta piperita Ph. Eur, para enmascarar el sabor amargo del principio activo.

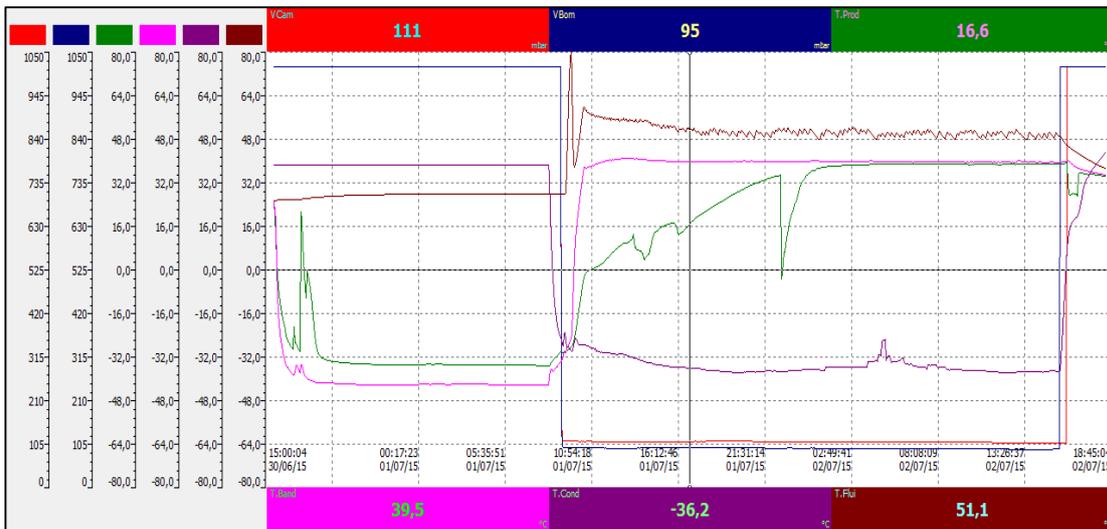


Fig. 60. Ciclo de liofilización pruebas de enmascaramiento de sabor.

## 5.7. VERIFICACIÓN DEL pH COMO CONTROL EN PROCESO DE FABRICACIÓN

El pH de las soluciones se ha medido en los puntos de control del proceso de fabricación donde se observa un posible cambio y/o mantenimiento del valor del pH.

Para la fabricación de las soluciones E1, E2 y E3 se consideraron todos los componentes, incluyendo los componentes que confieren dulzor y sabor al liofilizado (glicirricinato amónico, sucralosa y esencia menta piperita Ph. Eur.).

El glicirricinato amónico requiere disolución en agua purificada calentada a  $\pm 80-90^{\circ}\text{C}$  para su completa disolución. Una vez enfriada la solución a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), se ha añadido el edulcorante sucralosa hasta completa disolución. Seguidamente, se ha adicionado el agente de carga manitol, que se ha disuelto completamente. En este punto, el pH era de alrededor de 4,0. La solución seguía de aspecto transparente.

Al añadirse CTZ, la solución sufrió un viraje, puesto que el principio activo es una sal de carácter ácido cuando está disuelto en agua, que busca equilibrio con el carácter menos ácido del glicirricinato amónico. Tras pocos segundos (menos de 10 segundos), la solución recuperó la transparencia. La adición del principio activo bajó el valor de pH a  $\leq 2,0$ .

Se adicionó el PVP K30 poco a poco y mediante agitación vigorosa para su completa disolución. Seguidamente, se añadió la esencia de menta piperita y se enrasó con agua purificada a temperatura ambiente, a la cantidad suficiente para el volumen deseado. Una vez enrasada la solución, el valor de pH se mantiene  $\leq 2,0$ .

Con lo cual, los puntos de verificación del pH han sido tres: antes de la adición del principio activo, tras completa disolución del principio activo y tras enrase.

## 5.8. CARACTERIZACIÓN E1, E2 Y E3 (EN SOLUCIÓN)

### 5.8.1. T<sub>g</sub>' y perfil calorimétrico diferencial

Las soluciones E1, E2 y E3 se han analizado por técnica DSC, extrayéndose los datos de temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>') y presencia/ausencia de formas metaestables. Ninguna de las soluciones ha presentado formas metaestables.

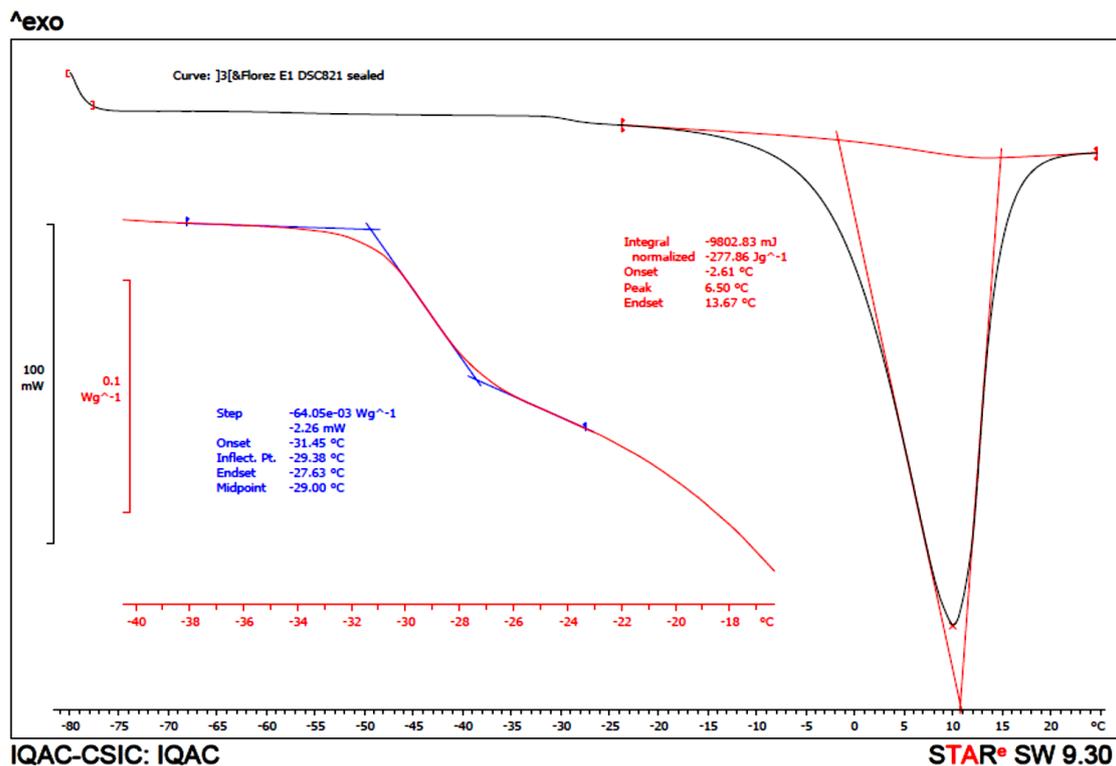


Fig. 61. Perfil calorimétrico de fórmula E1: 4,5% manitol y 7% PVP K30.

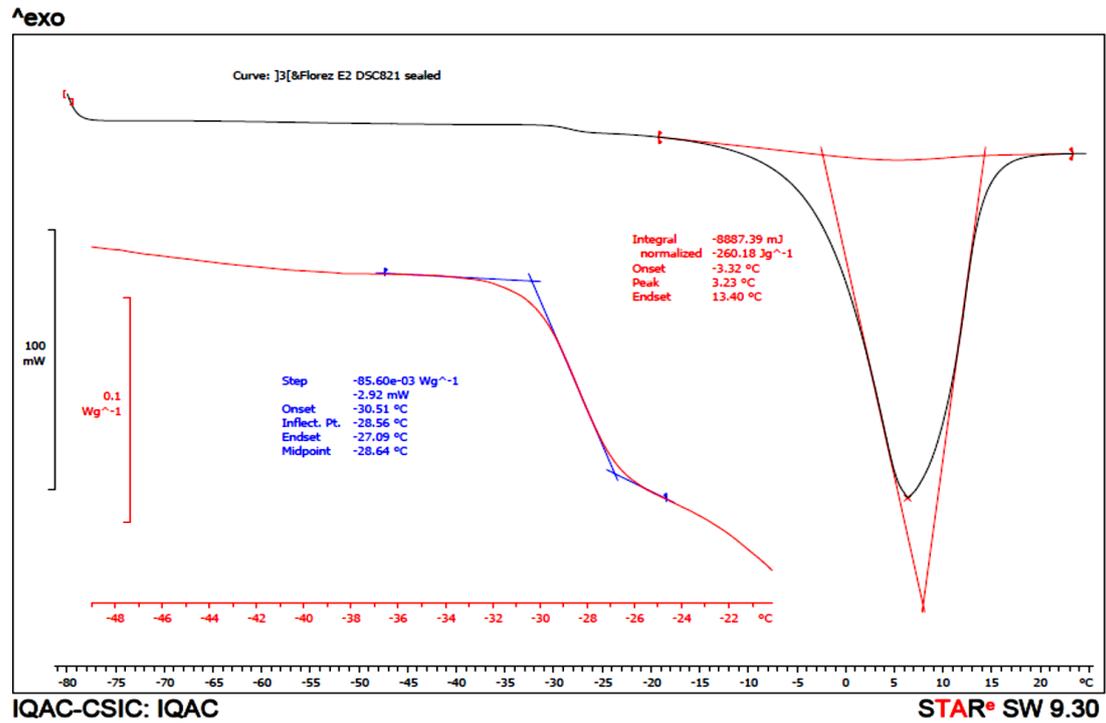


Fig. 62. Perfil calorimétrico de fórmula E2: 4,5% manitol y 10% PVP K30.

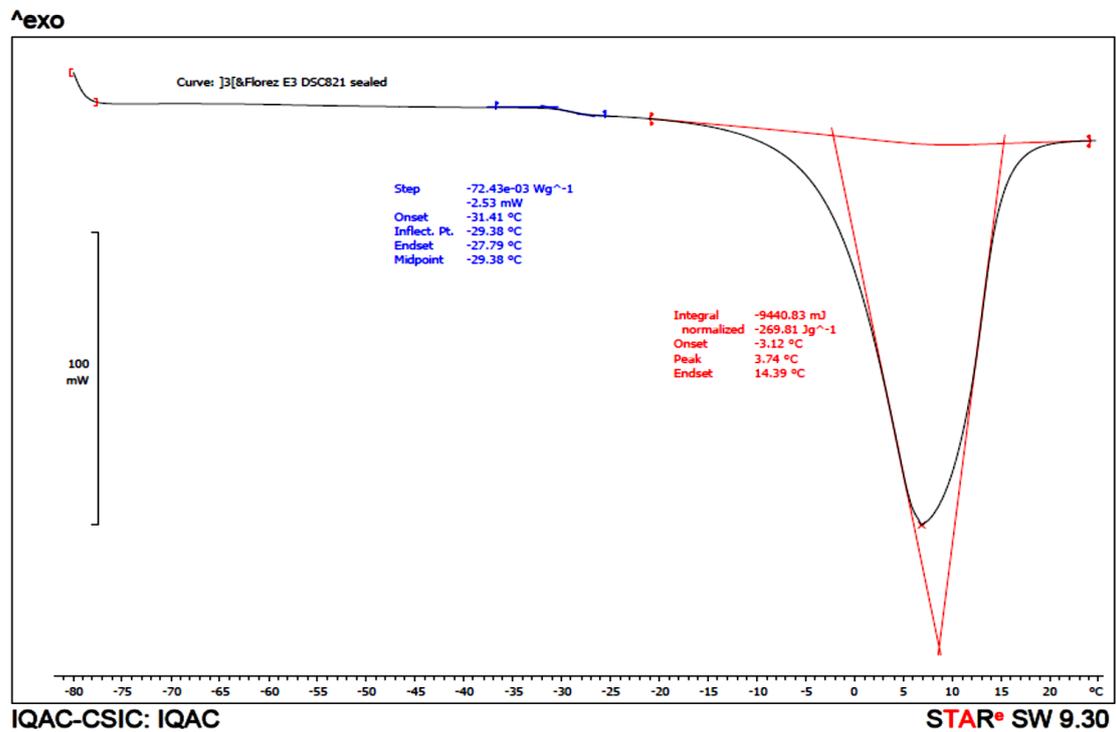


Fig. 63. Perfil calorimétrico de fórmula E3: 4,5% manitol y 8,5% PVP K30.

### 5.8.2. Perfil reológico y viscosidad

El ensayo permite verificar el perfil reológico y determinar la viscosidad de las soluciones estudiadas. Las tres soluciones presentaron un perfil reológico característico de un fluido newtoniano puesto que la tensión de cizalla ( $T = \text{Pa}$ ) y la velocidad de cizalla ( $\dot{\gamma} = 1/\text{s}$ ) presentaron una relación lineal entre ellas; la viscosidad es la pendiente de la recta (ver Fig 64). Se observa que a medida que la concentración de PVP K30 aumenta, también aumenta la viscosidad. También se puede apreciar en la Tabla 11 los resultados de cada replicado.

Tabla 11. Perfil reológico de soluciones E1, E2 y E3

Solución	Pa.s	Manitol (% p/v)	PVP K30 (% p/v)
E1.1	$0,004244 \pm 2,221\text{e-}05$	4,5	7
E1.2	$0,004406 \pm 2,297\text{e-}05$		
E2.1	$0,007191 \pm 3,378\text{e-}05$	4,5	10
E2.2	$0,006977 \pm 3,312\text{e-}05$		
E3.1	$0,005063 \pm 2,248\text{e-}05$	4,5	8,5
E3.2	$0,005238 \pm 2,354\text{e-}05$		

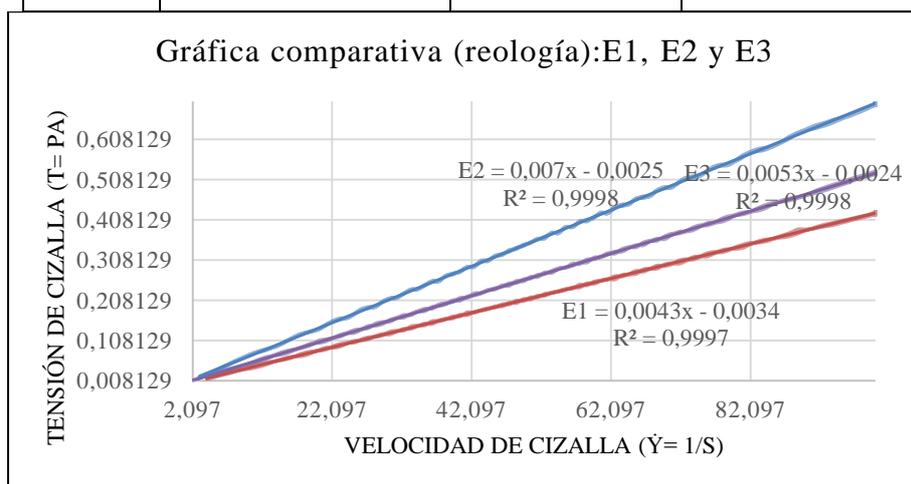


Fig. 64. Comparación de los perfiles reológicos de las tres soluciones E1, E2 y E3.

### 5.8.3. Densidad absoluta

La determinación de densidad absoluta ( $\text{g/cm}^3 = \text{g/ml}$ ) se considera un control en proceso en la fabricación de las soluciones. Se observa que el aumento de carga sólida corresponde al aumento en el cuarto decimal, no obstante, los resultados se consideran similares entre soluciones E2 y E3, por ejemplo.

Tabla 12. Densidades absolutas (g/ml) de las soluciones E1, E2 y E3

<b>Solución</b>	<b>Densidad absoluta (g/ml)</b>	<b>Manitol (% p/v)</b>	<b>PVP K30 (% p/v)</b>
<b>E1</b>	1,033	4,5	7
<b>E2</b>	1,040	4,5	10
<b>E3</b>	1,037	4,5	8,5

## 5.9. CARACTERIZACIÓN DE E1, E2 Y E3 (EN LIOFILIZADO ORAL)

### 5.9.1. SEM: microscopia electrónica de barrido

Tras ensayo de microscopia electrónica de barrido (SEM), se pudo observar la estructura interna de los liofilizados orales. Las microfotografías analizadas enseñaron que se trata de una estructura interna porosa y que al aumentar la concentración de PVP K30 (aglutinante), también aumenta la presencia de capas, con poros más reducidos. Eso se verifica al observarse las microfotografías del liofilizado oral E1 (con una concentración de 7% (p/v) de PVP K30), y un perfil similar se observa de los liofilizados E2 y E3, con 10% (p/v) y 8,5% (p/v) de PVP K30, respectivamente.

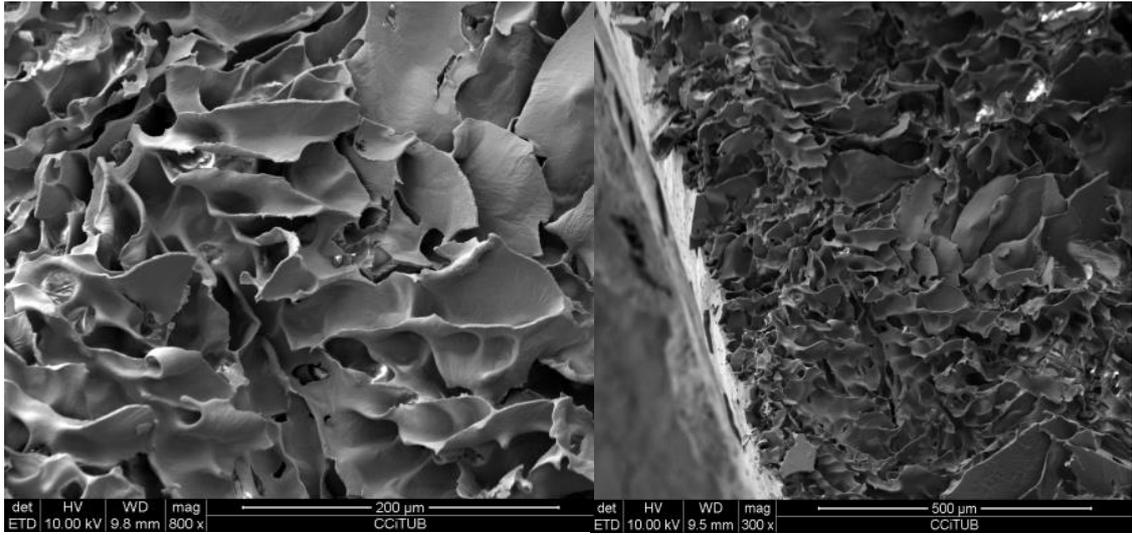


Fig. 65. SEM de liofilizado oral E1: 7% (p/v) PVP K30.

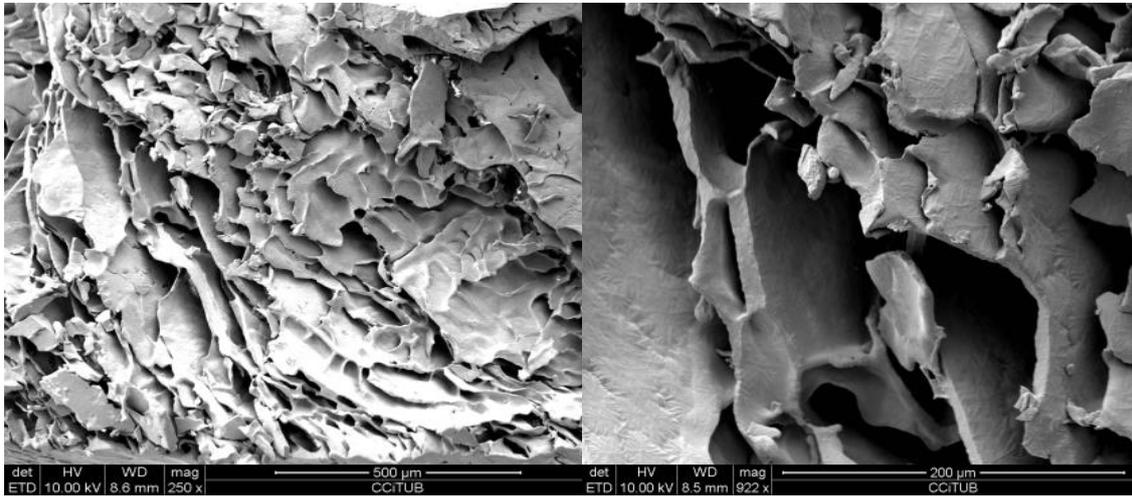


Fig. 66. SEM del liofilizado oral E2 10% (p/v) PVP K30.

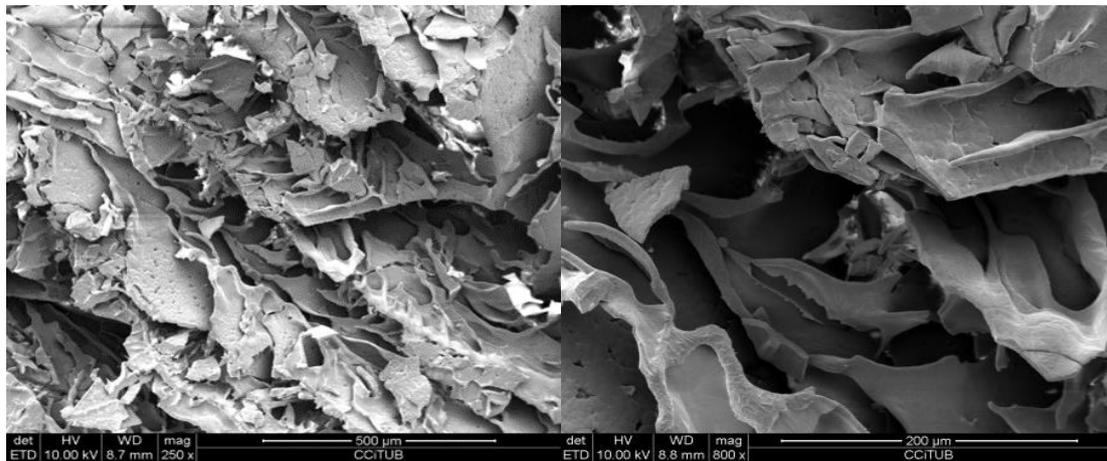


Fig. 67. SEM del liofilizado oral E3, con 8,5% (p/v) PVP K30.

### 5.9.2. **Tiempo de disgregación para liofilizados orales**

Se llevaron a cabo 7 determinaciones para cada liofilizado oral E1, E2 y E3, con muestras extraídas del liofilizador a tiempo 0 ( $t_0$ ), con agua purificada entre 16 – 23 °C. Los tiempos de disgregación obtenidos son inferiores al tiempo máximo 3 minutos estipulado por la Farmacopea Europea.

Tabla 13. Tiempo de desintegración promedio

<b>Solución</b>	<b>MNT/PVP (p/v) %</b>	<b>Tiempo de disgregación (segundos)</b>
E1	4,5% MNT + 7% PVP	13
E2	4,5 % MNT + 10% PVP	23
E3	4,5% MNT + 8,5% PVP	14

### 5.9.3. **Fracturabilidad del liofilizado oral**

El ensayo verifica la fuerza necesaria para romper las muestras de liofilizados orales. Debido al molde de PVC, los liofilizados orales presentan una cara cóncava y otra convexa. De esa forma, se ha analizado las dos caras de cada uno de los LO. Al ser un producto de característica porosa, se ha calculado el valor promedio de diez determinaciones tanto de la cara convexa superior como de la cóncava inferior, y para cada liofilizado oral (E1, E2 y E3).

Tabla 14. Resistencia a rotura de los liofilizados E1, E2 y E3

Fórmulas	PVP K30 (%)	Fuerza Cn Cara Cóncava Promedio (Newtons)	Fuerza Cn Cara Convexa Promedio (Newtons)
E1	7	364	61
E3	8,5	450	143
E2	10	479	174

Se observa que el aumento en la concentración de PVP K30 aumenta la resistencia del liofilizado oral a romperse. También se observa diferencias en cuanto a la cara del liofilizado oral; la cara cóncava resiste más a la presión de fracturabilidad ejercida que la cara convexa.

#### 5.9.4. Humedad residual: ensayo por Karl Fischer volumétrico.

Se ha analizado la humedad residual de muestras de liofilizados a tiempo 0 ( $t_0$ ) y a tiempo 30 días ( $t_{30}$ ) de las fórmulas E1, E2 y E3. Todas las muestras analizadas a  $t_0$  y  $t_{30}$  presentaron un resultado de 0,01% de humedad residual tras el secado secundario.

#### 5.9.5. Características organolépticas

Los liofilizados orales de las fórmulas E1, E2 y E3 han presentado sabor a menta, forma redonda y color blanco (ver Fig. 68).



Fig 68. Liofilizados orales E1, E2 y E3, de izquierda a derecha, envasados al vacío.

Tabla 15. Comparación de resultados cuantitativos entre fórmulas E1, E2 y E3 en solución y en liofilizado oral

Fórmulas	Caracterización: soluciones E1, E2 y E3		Caracterización: liofilizados orales E1, E2 y E3			
	Tg' (°C)	Viscosidad dinámica (Pa.s)	Tiempo de disgregación promedio (s)	Fuerza promedio lado cóncavo (Newtons)	Fuerza promedio lado convexo (Newtons)	Humedad residual (%) Karl-Fischer volumétrico
E1 7% (p/v) PVP K30	-31,45	0,0043	13	364	61	0,01
E2 10% (p/v) PVP K30	-30,51	0,0070	23	479	174	0,01
E3 8,5% (p/v) PVP K30	-31,41	0,0053	14	450	143	0,01

Tabla 16. Comparación de resultados cualitativos entre fórmulas E1, E2 y E3 en solución y en liofilizado oral

Fórmulas	Caracterización de las soluciones E1, E2 y E3			Caracterización de los liofilizados orales E1, E2 y E3	
	Formas metaestables (Sí/No)	Perfil reológico	Aspecto de la solución	Características organolépticas	SEM
E1 7% (p/v) PVP K30	No	Newtoniano	Solución transparente	Redondo, sabor a menta, lado cóncavo y convexo	Aspecto poroso
E2 10% (p/v) PVP K30					
E3 8,5% (p/v) PVP K30					

## 5.10. ESTUDIO DE ESTABILIDAD: DSV-TGA

Según normativa ICHQ1 (R2) (65), se hacen estudios de estabilidad con las siguientes temperaturas, según la zona climática. Se decide ensayar en condiciones de zona II, zona subtropical con posibilidad de presentar un nivel alto de humedad):

- 25 °C y a 60% HR durante 12 meses (estudio a largo plazo)
- 30 °C y a 65% HR durante 6 meses (estudio a plazo intermedio)
- 40 °C y a 75% HR durante 6 meses (estudio acelerado)

El ensayo de estabilidad mediante DSV es indicativo de la estabilidad de la formulación. Inicialmente, se ha ensayado con un barrido de humedad de 5 a 95%HR, manteniendo temperatura constante a 40 °C, como condiciones extremas de estabilidad. Las tres fórmulas no han sido capaces de mantenerse estables en estas condiciones.

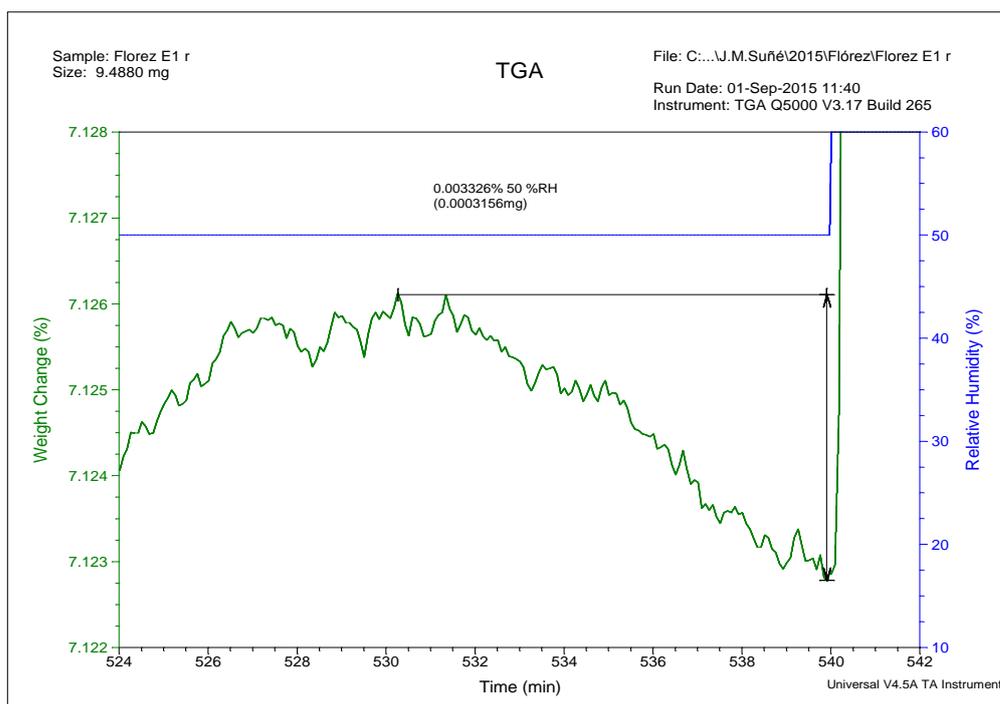


Fig. 69. Perfil TGA del liofilizado E1.

Siendo así, se ha ensayado otra vez con 25 °C a 60 %HR (condiciones de estudio a largo plazo). La fórmula E1 (4,5 % de manitol y 7% PVP K30), de 45%HR ha bajado hasta 20%HR transcurridos 10 minutos de haber alcanzado 45%HR (ver Fig. 69).

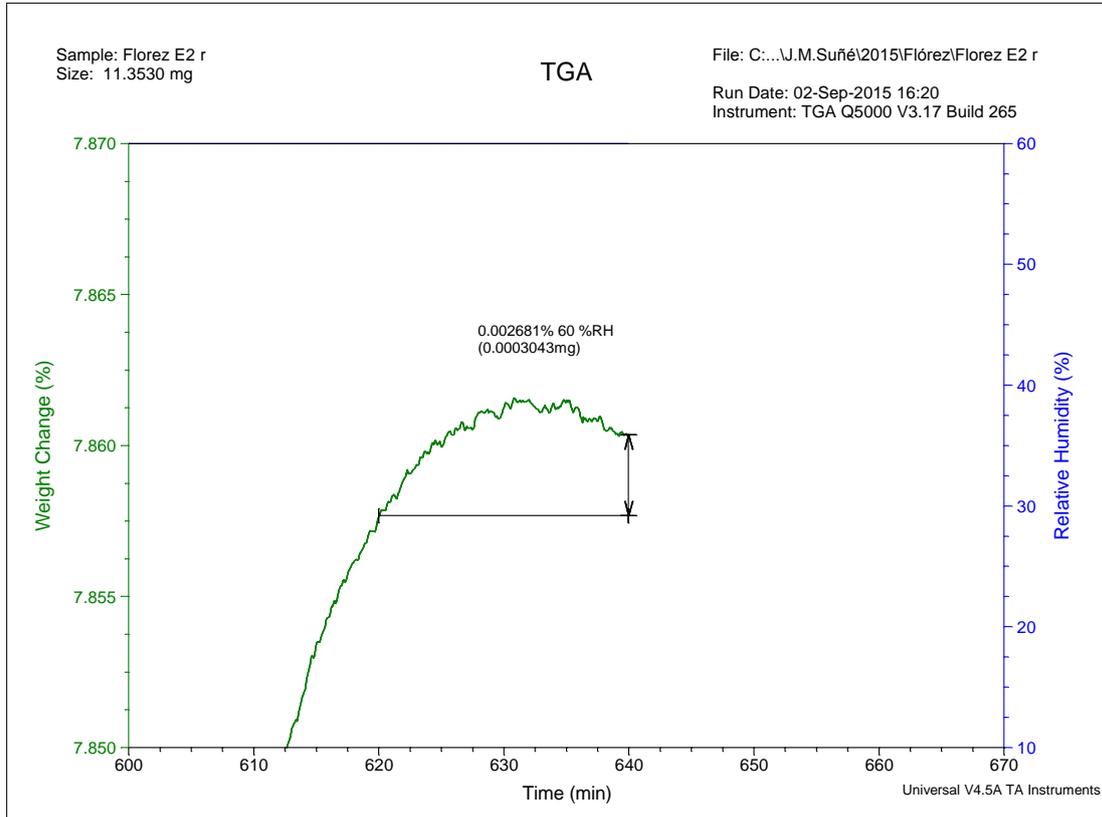


Fig. 70. Perfil TGA del liofilizado E2.

Para el liofilizado E2 (4,5 % manitol y 10% de PVP K30), se observa que no se ha mantenido estable a 40%HR puesto que transcurridos 5 minutos de haber alcanzado 40%HR, empieza a perder masa de agua, alcanzando 30%HR (ver Fig. 70).

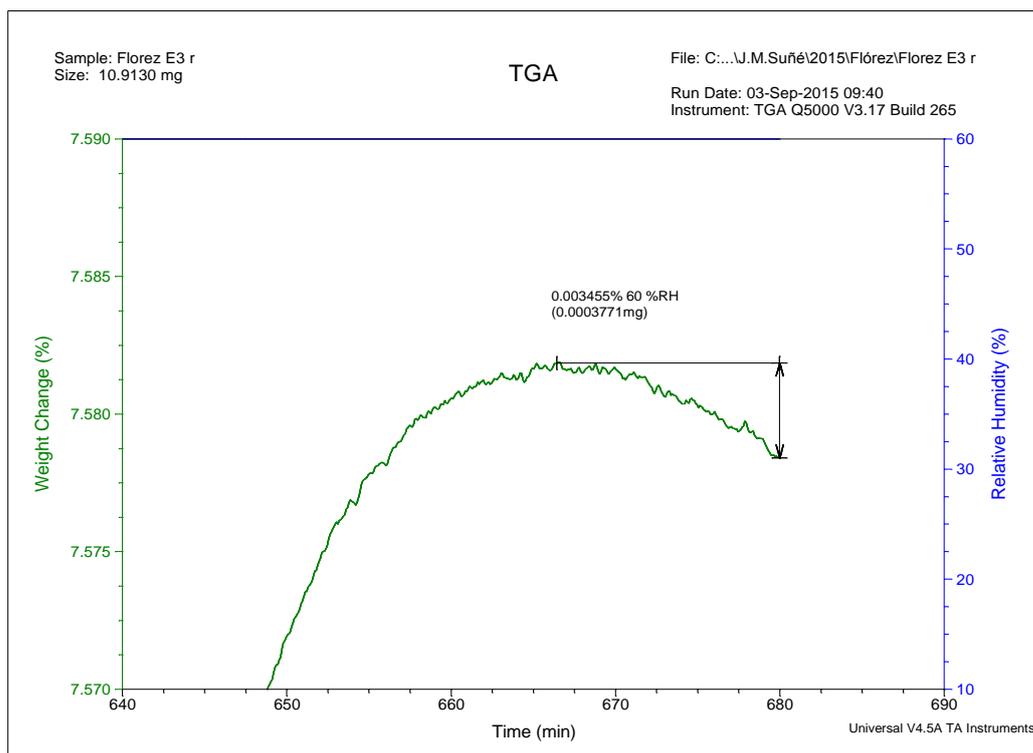


Fig. 71. Perfil TGA del liofilizado E3.

Para el liofilizado E3 (4,5% de manitol y 8,5% de PVP K30), se observa que se ha mantenido estable entre 40 y 30%HR, similar a lo que ocurre con el liofilizado E2, (Fig. 71), no obstante la pérdida de masa de agua ha sido más lenta durante el ensayo.

**DoE: Diseño factorial 3<sup>2</sup> con Manitol y PVP K30**

**Criterio: ausencia de formas metaestables mediante DSC, pruebas de viabilidad de liofilización en molde PVC y ensayos de caracterización**

Manitol al 2,0; 4,5 y 7,0% (p/v) x PVP K30 al 1,0; 3,0 y 5,0% (p/v)

A, B, C, D, E, F, G, H e I

A, D y E  
Sin formas metaestables

B, C, F, G, H e I  
Con formas metaestables

A: 2,0% Manitol + 3% PVP K30 (p/v)  
D: 2,0% Manitol + 5% PVP K30 (p/v)  
E: 4,5% Manitol + 5% PVP K30 (p/v)

B: 4,5% Manitol + 3% PVP K30 (p/v)  
C: 7,0% Manitol + 3% PVP K30 (p/v)  
F: 7,0% Manitol + 5% PVP K30 (p/v)  
G: 2,0 % Manitol + 1% PVP K30 (p/v)  
H: 4,5% Manitol + 1% PVP K30 (p/v)  
I: 7,0 % Manitol + 1% PVP K30 (p/v)

**Pruebas de viabilidad de liofilización**  
**Fórmula: E**  
Mejor aspecto y consistencia. Frágil al extraerse del molde

E1: 4,5% Manitol + 7,0 % PVP K30 (p/v)  
E2: 4,5% Manitol + 10,0 % PVP K30 (p/v)  
E3: 4,5% Manitol + 8,5% PVP K30 (p/v)

- DSC: tg' y perfil calorimétrico diferencial
- reología y viscosidad de las soluciones
- densidad absoluta de las soluciones
- pH de las soluciones
- SEM del liofilizado oral E1, E2 y E3
- tiempo de disgregación para liofilizados orales
- fracturabilidad del liofilizado oral
- humedad residual

## 6. FÓRMULAS DESARROLLADAS

### 6.1. CANTIDADES TEÓRICAS DE CTZ EN LIOFILIZADO ORAL Y % EN MATERIA SECA

Tabla 17. Cantidades teóricas de principio activo en LO y % en materia seca

Fórmulas	E1		E2		E3	
	mg *	% materia seca **	mg*	% materia seca **	mg*	% materia seca **
Glicirricinato amónico	0,5	0,72	0,5	0,60	0,5	0,65
Sucralosa	0,5	0,72	0,5	0,60	0,5	0,65
<b>Cetirizina dihidrocloruro</b>	<b>10</b>	<b>14,49</b>	<b>10</b>	<b>11,90</b>	<b>10</b>	<b>13,07</b>
Manitol	22,5	32,61	22,5	26,79	22,5	29,41
Povidona K30	35	50,72	50	59,52	42,5	55,56
Menta piperita	0,5	0,72	0,5	0,60	0,5	0,65
<b>Masa (mg)</b>	<b>69</b>	<b>100</b>	<b>84</b>	<b>100</b>	<b>76,5</b>	<b>100</b>

- \*dosis 0,5 ml

- \*\* LO

## 6.2. PROCESO DE FABRICACIÓN DE LAS REFERENCIAS E1, E2 Y E3

### 6.2.1. Materias Primas

Cetirizina dihidrocloruro cedido por Reig Jofre Group. Manitol Ph.Eur. y polivinilpirrolidona (PVP K30) Ph. Eur, glicirricinato amónico, esencia de menta piperita Ph. Eur., sucralosa (todos los excipientes son de Fagron Ibérica, SAU, Terrassa). Agua purificada.

### 6.2.2. Equipos

- Pesada de los componentes mediante balanza analítica
- Agitador y calefactor
- pHmetro
- densímetro

Las fabricaciones se llevaron a cabo con vasos de precipitado, probeta de 100 ml, placa calefactora y agitador magnético.

### 6.2.3. Proceso de Liofilización

Las soluciones se han dosificado en moldes de policloruro de vinilo (PVC) y dosificados con pipeta automática Multipette Plus Eppendorf (Hamburg, Germany). Cada dosis de 500 µl corresponde a 10 mg de principio activo. La liofilización se hizo mediante Liofilizador Telstar ® L-3 (Telstar, Terrassa, Spain). Tras el ciclo de liofilización de 24-28 horas, los moldes de PVC con liofilizados orales se envasan al vacío en bolsas de polietileno y se almacenan en desecadores con sílice gel.

#### 6.2.4. Componentes para E1, E2 y E3 al 2% (p/v) de CTZ

Tabla 18: Fórmula E1

- contiene en su composición 7% (p/v) de PVP K30 y 4,5% (p/v) de manitol.

<b>Concentración cetirizina dihidrocloruro (20 mg/ml)</b>						
<b>Nº</b>	<b>Nombre componentes</b>	<b>% (p/v)*</b>	<b>Para 0,5 ml (mg)</b>	<b>Para 60 ml (g)</b>	<b>Para 100 ml (g)</b>	<b>Para 1000 ml (g)</b>
1	Glicirricinato amónico	0,1	0,5	0,06	0,1	1
2	Sucralosa	0,1	0,5	0,06	0,1	1
3	Cetirizina diclorhidrato	2	10	1,2	2	20
4	Manitol	4,5	22,5	2,7	4,5	45
5	PVP K30	7	35	4,2	7	70
6	Esencia de menta piperita	1	0,5	0,06	0,1	1
7	Agua purificada	c.s.p.	dosis	c.s.p. 60 ml	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 1000 ml
<b>Rendimiento teórico</b>				120 LO	200 LO	2000 LO

\*peso/volumen (g/100 ml).

Tabla 19. Fórmula E2

-contiene en su composición 10% (p/v) de PVP-K30 y 4,5% (p/v) de manitol.

<b>Concentración cetirizina dihidrocloruro (20 mg/ml)</b>						
<b>N°</b>	<b>Nombre componentes</b>	<b>% (p/v)*</b>	<b>Para 0,5 ml (mg)</b>	<b>Para 60 ml (g)</b>	<b>Para 100 ml (g)</b>	<b>Para 1000 ml (g)</b>
1	Glicirricinato amónico	0,1	0,5	0,06	0,1	1
2	Sucralosa	0,1	0,5	0,06	0,1	1
3	Cetirizina dihidrocloruro	2	10	1,2	2	20
4	Manitol	4,5	22,5	2,7	4,5	45
5	PVP K30	10	50	6	10	100
6	Esencia de menta piperita	0,1	0,5	0,06	0,1	1
7	Agua purificada	c.s.p.	dosis	c.s.p. 60 ml	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 1000 ml
<b>Rendimiento teórico</b>				120 LO	200 LO	2000 LO

\*peso/volumen (g/100 ml).

Tabla 20: Fórmula E3

- contiene en su composición 8,5% (p/v) de PVP-K30 y 4,5% (p/v) de manitol.

<b>Concentración cetirizina dihidrocloruro (20 mg/ml)</b>						
<b>N°</b>	<b>Nombre componentes</b>	<b>% (p/v)*</b>	<b>Para 0,5 ml (mg)</b>	<b>Para 60 ml (g)</b>	<b>Para 100 ml (g)</b>	<b>Para 1000 ml (g)</b>
1	Glicirricinato amónico	0,1	0,5	0,06	0,1	1
2	Sucralosa	0,1	0,5	0,6	0,1	1
3	Cetirizina dihidrocloruro	2	10	1,2	2	20
4	Manitol	4,5	22,5	2,7	4,5	45
5	PVP K30	8,5	42,5	5,1	8,5	85
6	Esencia de menta piperita	0,1	0,5	0,6	0,1	1
7	Agua purificada	c.s.p.	dosis	c.s.p. 60 ml	c.s.p. 100 ml	c.s.p. 1000 ml
<b>Rendimiento teórico</b>				120 LO	200 LO	2000 LO

\*peso/volumen (g/100 ml).

### 6.2.5. Flujo y modo de preparación de E1, E2 y E3

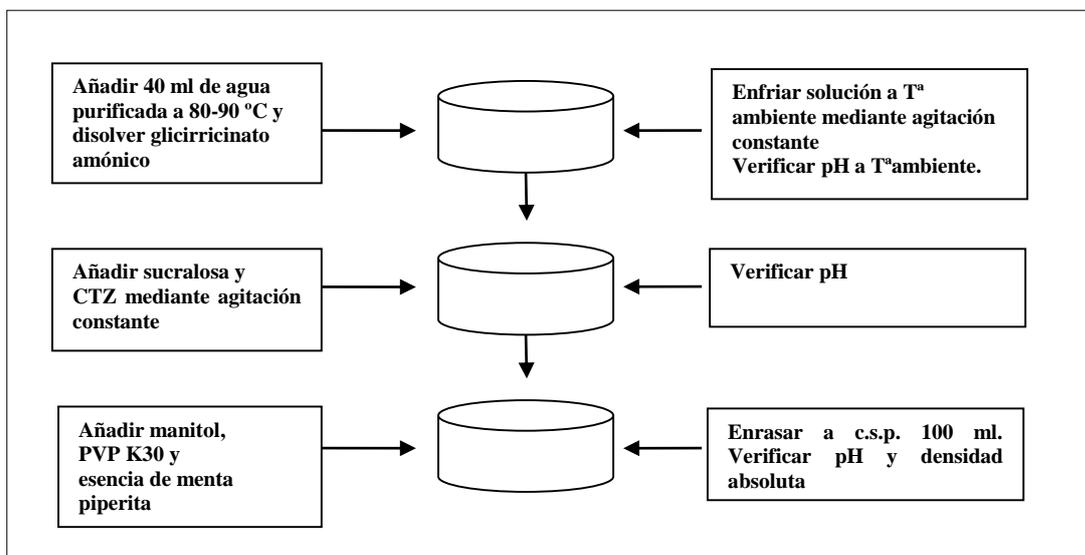


Fig. 72. Flujo de preparación de 100 ml de solución.

Método de preparación:

- a. Añadir 40 ml de ítem 7 a un vaso de precipitados de 100 ml, y calentar a 85-90 °C mediante placa de calefacción con agitador magnético.
- b. Añadir ítem 1 y disolver mediante agitación fuerte. Verificar completa disolución y enfriar la solución mediante agitación constante hasta alcanzar temperatura ambiente.
- c. Verificar pH.
- d. Añadir al paso a ítem 2, y disolver mediante agitación constante. Verificar completa disolución.
- e. Añadir ítem 3 (principio activo) y disolver mediante agitación constante. Verificar completa disolución.
- f. Verificar pH.
- g. Añadir ítem 4 y disolver mediante agitación constante. Verificar completa disolución.
- h. Añadir ítem 5 poco a poco para evitar la formación de grumos, y si necesario, aumentar velocidad de agitación. Verificar completa disolución. Si necesario, una

vez totalmente incorporado ítem 5, bajar velocidad de agitación para eliminar posibles burbujas de aire generadas en el proceso de disolución del ítem 5.

- i. Mediante agitación constante, añadir ítem 6. Verificar completa disolución.
- j. Enrasar a c.s.p. 100 ml.

OBS: la cantidad total consumida de agua purificada está en torno a 50 gramos (para 60 ml) y 85 gramos para 100 ml.

- k. Verificar aspecto: solución transparente.
- l. Verificar pH final y densidad absoluta.

#### 6.2.6. **Método de preparación de los liofilizados orales**

Preparar el Liofilizador Telstar ® L-3 para ciclo:

- Poner en marcha enfriamiento de cámara a -40 °C.
- Dosificar con micropipeta la dosis de 0,5 ml en cada alveolo de PVC.
- Depositar las placas de PVC dosificadas en bandejas de acero inoxidable
- Depositar las bandejas de acero inoxidable en la cámara de liofilización para congelación del producto por un tiempo mínimo de 2 horas.
- Aplicar ciclo de liofilización:
- Sublimación a baja presión (125 a 95 µbar) hasta secado secundario a 40 °C. El ciclo completo dura 24-28 horas.
- Cortar vacío y esperar estabilización de la cámara de liofilización.
- Extraer placas con LO y envasarlas mediante máquina envasadora al vacío Food saver en bolsas de polietileno.
- Almacenar placas envasadas en desecadores con sílice gel.

#### 6.2.7. **Controles en proceso**

- Aspecto: Liofilizado oral redondo, de color blanco, sin grietas.
- Características organolépticas: sabor a menta.
- Peso del liofilizado oral (promedio de 6 liofilizados orales).
- Control de humedad: control con 6 liofilizados orales de cada fórmula.
- Humedad residual: Indicar resultado.
- Ensayo de desintegración con 6 liofilizados orales: no puede exceder a 3 minutos (preferentemente en menos de 1 minuto).

## **DISCUSIÓN GLOBAL**



## 7. DISCUSIÓN GLOBAL

### 7.1. DESARROLLO DE LA FORMULACIÓN

Según el artículo de Seager, 1998 (3), la dosis de fármacos hidrosolubles es generalmente limitada a un máximo de 60 mg. Además, indica que la dosis depende del comportamiento del fármaco durante el proceso de congelación y en la característica que presente el mismo durante el proceso de secado. Se indica, además, que mezclas eutécticas se pueden generar, y que pueden no congelarse adecuadamente, o sufrir *melt-down* con las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de liofilización. Otro punto que se indica en el mismo artículo es la posibilidad del fármaco hidrosoluble de generar un sólido amorfo, vítreo, durante el paso de congelación, y de que éste pueda sufrir colapso en la fase de secado primario debido a la sublimación del hielo y de la pérdida de estructura de soporte. Como alternativas para solucionar este problema, el autor propone utilizar excipientes que confieran cristalinidad al liofilizado, es decir, rigidez a los productos amorfos. Otra alternativa propuesta por el autor es la de incluir en la fórmula una resina de intercambio iónico que se una al fármaco hidrosoluble, de modo a generar un complejo insoluble en agua. La tercera propuesta es la de dosificar una solución no acuosa del principio activo en unidades de placebos preformados. El disolvente orgánico es entonces evaporado y el fármaco recristalizado se deposita en los poros del liofilizado.

En el liofilizado de CTZ desarrollado, la dosis de cada liofilizado contiene 10 mg de principio activo. De esta manera, la cantidad de principio activo hidrosoluble es inferior al máximo indicado del estudio de Seager (3). Otro aspecto a tenerse en cuenta es la obtención de una pastilla liofilizada robusta de CTZ, en ausencia de excipientes, tras el estudio de viabilidad de liofilización (ver Fig. 31). El producto no ha presentado el fenómeno de *melt-back* o de colapso tras el proceso de secado, lo que descarta el uso de resina de intercambio iónico sugerido por el mismo artículo (3). Mediante ensayo DSC para el principio activo, en ausencia de excipientes, CTZ no ha presentado formas metaestables, con una  $T_g'$  de  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todo eso indica la viabilidad de producir liofilizados orales de CTZ, con la alternativa de añadir los excipientes comúnmente utilizados para tal fin, para facilitar el mantenimiento de la estructura rígida, facilitando la disgregación en segundos de la forma farmacéutica y dejando un sabor agradable en

la boca. Siendo así, se propone inicialmente utilizar solo el excipiente manitol, conocido por aportar rigidez a la estructura liofilizada y buena redispersión.

Tras los resultados del estudio de viabilidad de liofilización en vial con manitol y CTZ se han obtenido resultados aceptables en cuanto al aspecto de la pastilla liofilizada con la concentración al 2% (p/v) de manitol. Concomitantemente, se estudió la posibilidad de utilizar PVP K30 como único agente de carga. Visto los resultados de la prueba de viabilidad con PVP K30 y CTZ en vial, con un resultado aceptable de PVP K30 al 5% (p/v), se verifica la viabilidad de la misma combinación pero en molde de PVC, con un resultado no conforme por presentar un liofilizado agrietado. Así, se decide probar la combinación entre PVP K30 y manitol en las concentraciones que han generado pastillas en vial aceptables, con PVP K30 al 5% (p/v), manitol al 2% (p/v) y CTZ al 1% (p/v) en vial. Visto que el resultado era aceptable en vial, se prueba en molde de PVC la misma combinación. Se genera un liofilizado a simple vista uniforme, pero muy frágil al extraerse del molde. Además, se verifica el papel aglutinante ejercido por el PVP K30 en la combinación con manitol. Siendo así, se ha visto que el mejor resultado ha sido la combinación entre excipientes y CTZ, presentando liofilizados aceptables en vial y molde de PVC. Se probaron las mismas concentraciones de excipientes a distintas concentraciones de CTZ, y se ha estipulado la mejor dosis y concentración de CTZ de partida, siendo esa 2 % (p/v) o 20 mg/ml y el molde redondo de PVC con capacidad para 0,5 ml (correspondiendo a una dosis de 10 mg de CTZ).

Antes de efectuar el diseño factorial, se analizaron por DSC cada excipiente por separado (manitol y PVP K30) con tres concentraciones diferentes cada uno – manitol a 2; 4,5 y 7% (p/v) y PVP K30 a 1; 3 y 5% (p/v)-, y CTZ a 20 mg/ml (ver figuras 37-43) . La técnica ha determinado que todas las concentraciones de manitol han presentado formas metaestables, con  $T_g'$  de aproximadamente  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$  (promedio entre las tres concentraciones). De las tres concentraciones de PVP K30 analizadas, ninguna ha presentado formas metaestables, con  $T_g'$  entre  $-22,31\text{ }^{\circ}\text{C}$  para PVP K30 al 1% (p/v),  $-25,31\text{ }^{\circ}\text{C}$  para PVP K30 al 3% (p/v) y  $-33,72\text{ }^{\circ}\text{C}$  para PVP K30 al 5% (p/v). El resultado del análisis mediante DSC de las tres concentraciones de manitol estudiadas ha indicado que no se recomienda utilizar manitol como único agente de carga debido a la presencia de formas metaestables en todas las concentraciones estudiadas. Además, con los resultados de las pruebas de viabilidad de liofilización llevadas a cabo con PVP K30 al

5% (p/v) y principio activo al 1% (p/v), el liofilizado obtenido en vial había presentado un aspecto agrietado, indicando la necesidad de añadir otro excipiente que pudiera conferir una estructura más rígida al liofilizado (que es exactamente el aporte buscado con la adición de manitol a la fórmula). Así, se ha procedido a continuar el estudio, estableciéndose distintas concentraciones de manitol y PVP K30 con CTZ para efectuar el diseño factorial.

Para establecer las concentraciones de PVP K30 se ha tenido en cuenta que el excipiente puede incrementar la  $T_g'$  para facilitar el proceso de secado primario (39); debido a su perfil higroscópico, se ha decidido no incrementar de inicio la concentración de PVP K30 y mantener como máxima concentración estudiada la de 5% (p/v). Asimismo, desconociendo *a priori* el resultado de las combinaciones entre excipientes en cuanto a la aparición de formas metaestables, se ha mantenido en el estudio factorial  $3^2$  las concentraciones al 1, 3 y 5% (p/v) de PVP K30 combinándolas con las concentraciones crecientes de manitol al 2; 4,5 y 7% (p/v) propuestas (teniendo la concentración al 2% de manitol (p/v) como punto de partida por ser la concentración que en las pruebas de viabilidad de liofilización con manitol y CTZ, ha mantenido una forma rígida aceptable en vial).

A partir de cada una de las concentraciones comentadas anteriormente, han surgido nueve combinaciones diferentes (soluciones A, B, C, D, E, F, G, H e I) entre manitol y PVP K30 para análisis de  $T_g'$  y presencia/ausencia de formas metaestables mediante DSC, con CTZ. De las nueve soluciones propuestas, tres (A, D y E) no presentaron formas metaestables (ver figuras 44, 47, 48). Analizando las soluciones que no presentaron formas metaestables (ver Tabla 10), se observa que todas presentan concentraciones superiores de PVP K30 (p/v) en relación a la concentración de manitol (p/v) - solución A (3% PVP K30, 2% manitol), solución D (5% PVP K30, 2% manitol) y solución E (5% PVP K30, 4,5% manitol p/v), indicando que, para que el PVP K30 controle la aparición de formas metaestables generadas por el manitol, se requiere añadir siempre una mayor proporción de PVP K30 que de manitol, lo que corresponde a los resultados obtenidos con las seis soluciones que presentaron formas metaestables en el estudio  $3^2$  (soluciones B, C, D, F, G, H e I), todas presentando concentraciones de manitol superiores a las concentraciones de PVP (ver figuras 45-46, 49-52, y Tabla 10).

Se ha llevado a cabo una prueba de viabilidad de liofilización en moldes de PVC con las soluciones A, D y E. La solución E (4,5% manitol y 5% PVP K30 p/v) ha presentado un liofilizado con un aspecto más compacto que la solución A y D, pese a presentar grietas en los bordes. Tras esta prueba, se descarta seguir con las soluciones A y D. Se mantiene la concentración de manitol al 4,5% (p/v), añadiéndose PVP K30 al 7% (p/v) denominado solución E1, PVP K30 al 10% (p/v) denominado E2, y una concentración intermedia de PVP K30 (8,5% p/v), denominada E3.

Mediante análisis DSC para las soluciones E1, E2 y E3 (ver figuras 61-63) se observa que las tres soluciones presentan una Tg' de aproximadamente -31 °C, y ninguna presenta formas metaestables. Teniendo como punto de partida la solución E que presentó una Tg' de -32,2 °C, el incremento en la concentración de PVP K30 ha aumentado la Tg' en 1-2 grados máximo en las Tg' de las soluciones E1, E2 y E3. Es decir, las tres soluciones (E1, E2 y E3) siguieron sin presentar formas metaestables; no obstante, el aumento en la Tg' que podría conferir la adición de PVP K30 no ha sido substancial.

## 7.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS FÓRMULAS E1, E2 Y E3

### 7.2.1. En solución

Teniendo en cuenta que las soluciones E1, E2 y E3 presentan concentraciones de PVP K30 superiores a la concentración de manitol (que se mantiene en un 4,5 % (p/v) en todas ellas), el excipiente que rige la viscosidad de dichas soluciones es el mismo PVP K30. El análisis de reología llevado a cabo, se verifica un incremento de la viscosidad correspondiente con el aumento en la concentración de PVP K30; asimismo, este incremento no es substancial visto que todas las soluciones mantienen un perfil newtoniano, lo que caracteriza soluciones muy similares en comportamiento al agua (ver Tabla 11, Fig. 64). En cuanto a la densidad absoluta (ver Tabla 12), también se observa un aumento en los valores de densidad proporcional al aumento en la concentración de PVP K30; sin embargo, no se observan diferencias significativas puesto que se trata del tercer decimal. La determinación de pH en los mismos puntos establecidos en la fabricación de las soluciones (antes de la adición del principio activo, tras la adición del principio activo y tras el enrase) tampoco presenta diferencias entre dichas soluciones.

### 7.2.2. En liofilizado

En cuanto a las características organolépticas de los liofilizados orales estudiados, se tuvo en cuenta enmascarar el sabor amargo del principio activo CTZ. Un estudio publicado este año 2015 (80) propone el uso de ciclodextrinas para enmascarar el sabor amargo del principio activo CTZ en una formulación de liofilizado oral. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la viabilidad de liofilización de CTZ y de los resultados obtenidos tras encontrar las combinaciones de manitol y PVP K30 idóneas tras ensayo DSC, se han considerado excipientes que también se utilizan en formulaciones de liofilizados orales (como puede ser el edulcorante sucralosa y glicirricinato amónico) y el saborizante menta piperita Ph. Eur. De esta manera, se ha añadido a las tres fórmulas estudiadas (E1, E2 y E3) un 0,1% (p/v) de sucralosa, un 0,1% (p/v) de glicirricinato amónico y un 0,1% (p/v) de esencia de menta piperita Ph. Eur (77, 78). Todos los liofilizados ensayados (E1, E2, y E3) han presentado sabor a menta de forma satisfactoria.

El tiempo de disgregación debe preferentemente ser rápido y completo de modo que no se detecten partículas sin disolver en la lengua. Siendo así, se ha efectuado el ensayo siguiendo instrucciones de la Ph. Eur para liofilizados orales. De los resultados obtenidos, se observa que el incremento en la concentración de PVP K30 hace que aumente el tiempo de disgregación, siendo éste no superior a 30 segundos en todos los liofilizados (ver Tabla 13).

En cuanto a la resistencia mecánica de los liofilizados orales ensayados, tras la prueba de viabilidad de liofilización con las tres soluciones (E1, E2 y E3) se observa que los liofilizados E1 son los más frágiles a la manipulación del molde de PVC, y los liofilizados E2 y E3 son los que presentan mejor aspecto final (sin rotura al extraerlos del molde de PVC). Además, se pudo verificar la resistencia a la fractura tras el ensayo de fracturabilidad de los liofilizados E1, E2 y E3 (ver Tabla 14). Los resultados promedio obtenidos tanto de la fuerza aplicada para la rotura de la cara convexa y de la cara cóncava de 10 liofilizados/cara indican que el incremento en la concentración de PVP K30 es proporcional a la resistencia a la rotura obtenida, lo que indica el efecto del PVP K30 en las fórmulas.

A partir de los resultados del análisis SEM (ver figuras 65-67), se ha podido verificar que el incremento en la concentración de PVP K30 también afecta la morfología interna de los liofilizados. Se observa el aspecto poroso de todos los liofilizados (E1, E2 y E3), además de observarse que las cantidades crecientes de PVP K30 generan más capas y poros más pequeños (como en E2, que contienen 10% (p/v) de PVP K30).

La técnica Karl-Fischer volumétrico de los tres liofilizados ha indicado que tras el ciclo de liofilización aplicado, la humedad residual ha sido de 0,01% para las tres fórmulas, lo que indica que el proceso de liofilización aplicado ha sido efectivo. No obstante, se debe tener en cuenta que sería interesante aplicar la técnica Karl-Fischer coulométrica de modo a poder determinar trazas de humedad en las muestras liofilizadas.

### 7.2.3. **Análisis de estabilidad acelerada**

Para el análisis de estabilidad acelerada mediante la técnica TGA, se ha observado que el liofilizado E1 con 4,5% manitol y 7% PVP K30 (p/v), a 25 °C, no consigue mantenerse estable a 40%HR. Para el liofilizado E1, las condiciones de estabilidad idóneas se mantendrían entre 25 °C y 30%HR. Los liofilizados E2 (4,5% manitol y 10% PVP K30 p/v) y E3 (4,5% manitol y PVP K30 8,5% p/v) consiguen alcanzar 40%HR a 25 °C. No obstante, se observa que entre E2 y E3, el liofilizado E3 es el que se mantiene un poco más estable en estas mismas condiciones. Pese a que las soluciones E1, E2 y E3 no presentaron formas metaestables mediante estudio DSC, mediante el estudio TGA de estabilidad acelerada, se observa que todos los liofilizados presentan dificultad en mantenerse estables, como mínimo, a niveles superiores a 40%HR (a 25 °C), y que de los tres liofilizados, el E3 es el que intenta mantenerse estable por más tiempo, considerándose como la fórmula más estable de las tres ensayadas. No obstante, ninguna de las fórmulas ha podido mantenerse estable a más de 40%HR de manera sostenida en el tiempo, lo que indica que presentan baja estabilidad a temperaturas y humedades altas. Todo y así, hay que tener en cuenta que el estudio se lleva a cabo en ausencia del envase final, lo que indica la necesidad de por un lado, añadir un tercer excipiente que aumente la Tg' de la fórmula, lo que podría auxiliar a mantener el liofilizado estable por más tiempo, y por otro lado, hacer el estudio de estabilidad indicado por ICHQ1A(R2) con el liofilizado oral E3 acondicionado en PVC y /o blíster especial de aluminio laminado (que confiere un entorno más protegido a la forma farmacéutica).

## **CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

1. Un método nuevo y sencillo de RP-HPLC fue desarrollado para la determinación de CTZ y sus productos de degradación. El método propuesto se demostró ser lineal, preciso, exacto y específico. Se obtuvieron resultados satisfactorios en la separación del pico de CTZ de sus productos de degradación.
2. El método analítico desarrollado es un método rentable que requiere una fase móvil sencilla (solución reguladora de fosfato y acetonitrilo, 65:35 v/v). Además, no requiere uso de par iónico, aumentando el tiempo de uso de la columna cromatográfica.
3. Las formulas ensayadas (en solución) son fáciles de preparar, contienen excipientes que se disuelven fácilmente en medio acuoso.
4. El perfil térmico diferencial obtenido tras el diseño factorial  $3^2$  mediante DSC ha sido determinante para el establecimiento de las soluciones sin formas metaestables (A, D y E), mientras que el estudio de viabilidad de liofilización ha sido importante para determinar la mejor fórmula liofilizada de partida de entre las que no presentaron formas metaestables, estableciéndose la concentración máxima de manitol (4,5% p/v) que no afectara a la formulación, además de indicar la viabilidad en el uso del PVP K30 como agente estabilizador en la formulación, al observarse que cuando se ha añadido en concentraciones superiores a la de manitol, ha evitado la aparición de formas metaestables.
5. El ciclo de liofilización utilizado ha sido capaz de producir los liofilizados orales sin que se presentara colapso o melt-back en las fórmulas estudiadas finales (E1, E2 y E3).
6. En términos de caracterización del líquido y del liofilizado oral, las tres fórmulas (E1, E2 y E3) han presentado resultados coherentes con el aumento en la concentración de PVP K30, teniendo en cuenta los resultados de densidad, viscosidad, fracturabilidad, SEM.
7. Las fórmulas E2 y E3 son las mejores en términos de buena resistencia mecánica, disgregación rápida. No obstante, es la fórmula E3 la que ha presentado un mejor perfil de estabilidad en el estudio de estabilidad acelerada mediante DVS, lo que

determina la fórmula E3 como la más indicada como base del liofilizado oral de CTZ.

8. A partir de la fórmula E3, se propone llevar a cabo nuevos estudios, como la adición de un tercer excipiente que aumente la Tg' obtenida, para hacer un estudio de estabilidad en paralelo entre la fórmula E3 y la nueva, con un material de acondicionado primario adecuado (protegiendo la forma farmacéutica de la luz y de la humedad ambiental) siguiendo las normas ICHQ1A (R2), con el objetivo de determinar la mejor fórmula para el liofilizado oral de CTZ.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. European Pharmacopoeia, 8th edition (2015): <http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep807/>  
[Acceso 20/10/2015, monografía comprimidos Ph. Eur 8.7]
2. Corveleyn D, Remon JP. Formulation and production of rapidly disintegrating tablets by lyophilisation using hydrochlorotiazide as a model drug. *Int J Pharm*, 1997; 152: 215-225.
3. Seager H. Drug-delivery products and the Zydis fast-dissolving dosage form. *J Pharm Pharmacol*, 1998; 50 (4): 375-82.
4. Aulton ME. Drying. En Aulton ME *Pharmaceutics. The science of dosage form design*. Second edition. Churchill Livingstone. London, 2002: 390-393.
5. Suñé Negre JM. Liofilización. En Faulí Trillo. *Tratado de Farmacia Galénica*. Primera edición. Luzán 5 de Ediciones S.A. Madrid, 1993: 305-14.
6. Jennings TA. Introduction and Product Formulation. En Jennings TA *Lyophilization. Introduction and basic principles*. Interpharm Press. Denver, 1999: 1-33.
7. Franks F. Essentials Physics of Low Temperature and Freezing: Physical properties of undercooled water. En Franks F. *Freeze drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: principle and practice*. RSC Publishing. Cambridge, 2007: 29-32.
8. Vaclavik V, Christian EW. Water. En Vaclavik V, Christian EW *Essentials of Food Science*. Fourth edition. Springer. New York, 2014: 21-23.
9. Baheti A, Kumar L, Bansal AK. Excipients used in lyophilization of small molecules. *J Excip Food Chem*, 2010; 1: 41-54.
10. Sundaramurthi P, Suryanarayanan R. Calorimetry and complementary techniques to characterize frozen and freeze-dried systems. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012; 64: 384-95.
11. Geidobler R, Winter G. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013; 85: 214-222.
12. Velardi SA, Barresi AA. Development of simplified models for freeze drying process and investigation of the optimal operating conditions. *Chem Eng Res Des*, 2008; 86: 9-22.

13. AlHusban F, Perrie Y, Mohammed AR. Formulation and characterization of lyophilized rapid disintegrant tablets using aminoacids as matrix forming agents. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010; 75: 254-262.
14. Ahmed I, Aboul-Einem MH. In vitro and in vivo evaluation of a fast disintegrating tablets lyophilized dry emulsion containing griseofulvin. *Eur J Pharm Sci*, 2007; 32: 58-68.
15. Chandrasekhar R, Hassan Z, AlHusban F, Smith AM, Mohammed AR. The role of formulation excipients in the development of lyophilized fast-disintegrating tablets. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009; 72:119-129.
16. Fernandes Tavares DF, Espada García JI, Martín Sabroso C, Gil Alegre ME, Torres Suárez AI. Comprimidos bucodispersables: ventajas terapéuticas y tecnológicas de elaboración. *Ars Pharm*, 2009; 50: 153-167.
17. Jalbout AF, Shipar AH, Navarro JL. Density functional computational studies on ribose and glycine Maillard reaction: formation of the Amadori rearrangement products in aqueous solution. *Food chem*, 2007; 103: 919-926.
18. Jaeger H, Janositz A, Knorr D. The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathol Biol*, 2010; 58: 207-213.
19. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Sixth Edition. Pharmaceutical Press. London-Chicago, 2009.
20. Nabors LO. *Alternative sweeteners*. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Ratón, 2012: 333- 347.
21. Mizumoto T, Masuda Y, Yamamoto T, Yonemochi E, Terada K. Formulation design of a novel fast-disintegrated. *Int J Pharm*, 2005; 306: 83-90.
22. Kim AI, Akers MJ, Nail SL. The physical state of mannitol after freeze-drying: Effects of mannitol concentration, freezing rate, and a noncrystallizing cosolute. *J Pharm Sci*, 1998; 87: 931–935.
23. Yoshinari T, Forbes RT, York P, Kawashima Y. Moisture induced polymorphic transition of mannitol and its morphological transformation. *Int J Pharm*, 2002; 247: 69-77.
24. Abdelwadeh W, Degobert G, Fessi H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006; 63: 87-94.

25. Hawe A, Frieß W. Physico-chemical lyophilization behavior of mannitol, human serum albumin formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006; 28: 224-232.
26. Hirani JJ, Rathod AD, Vadalia RK. Orally disintegrating tablets: A review. *Trop J Pharm Res*, 2009; 2: 161-172.
27. Ursino MG, Poluzzi E, Caramella C, de Ponti F. Excipients in medicinal products used in gastroenterology as a possible cause of side effects. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011; 60: 93-105.
28. Hawe A, Frieß W. Impact of freezing procedure and annealing on the physico-chemical properties and the formation of mannitol hydrate in mannitol-sucrose-NaCl formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006; 64: 316-325.
29. Bühler V. Kollidon®. Polyvinylpyrrolidone excipients for the pharmaceutical industry. Ninth edition. BASF SE. Ludwigshafen, 2008: 17-41.
30. Alkeran (Melphalan for injection): <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archivid=13952> [Acceso 20/10/2015].
31. Baird JA, Taylor, LS. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012; 64: 396-421.
32. Meister E, Šaši S, Gieseler H. Freeze-Dry Microscopy: Impact of Nucleation Temperature and Excipient Concentration on Collapse Temperature Data. *AAPS PharmSci*, 2009; 10: 582- 588.
33. Kawakami K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012; 64: 480- 495.
34. Kadaji VG, Betageri GV. Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymer* 2011; 3: 1972-2009.
35. Tong HHY, Du Z, Wang GN, Chan HM, Chang Q, Lai LCM, Chow AHL, Zheng Y. Spray freeze-drying with polyvinylpyrrolidone and sodium caprate for improved dissolution and oral bioavailability of oleanolic acid, a BCS Class IV compound. *Int J Pharm*, 2011; 404: 148-58.

36. Craig DQ, Royall PG, Kett VL, Hopton ML. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze-dried systems. *Int J Pharm*, 1999; 179:179–207.
37. Sammour OA, Hammad, MA, Megrab NA, Zidan AS. Formulation and optimization of mouth dissolve tablets containing rofecoxib solid dispersion. *AAPS PharmSci* 2006; 7: 167-175.
38. Kasper JC, Friess W .The freezing step in lyophilisation: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; 78: 248-263.
39. Jo E. Determinación experimental de los parámetros para la liofilización en producción farmacéutica. Tesis doctoral. Barcelona, 2005.
40. del Barrio MA, Hu J, Zhou P, Cauchon N. Simultaneous determination of formic acid and formaldehyde in pharmaceutical excipients using headspace GC/MS. *J Pharmaceut Biomed*, 2006; 41: 738 – 743.
41. Hartauer KJ, Arbuthnot GN, Baertschi SW, Johnson RA, Luke WD, Pearson BG, Rickard EC, Tingle CA, Tsang PKS, Wiens RE. Influence of peroxide impurities in povidone and crospovidone on the stability of raloxifene hydrochloride in tablets: Identification and control of an oxidative degradation product. *Pharm Dev Technol*, 2000; 5: 303 – 310.
42. D'Souza AJM, Schowen RL, Borchardt RT, Salsbury JS, Munson EJ, Topp EM. Reaction of a peptide with polyvinylpyrrolidone in the solid state. *J Pharm Sci*, 2003; 92: 585 – 593.
43. Wu Y, Levons J, Narang AS, Raghavan K, Rao VM. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug–Excipient Incompatibility. *AAPS PharmSci*, 2011; 12: 1248-1263.
44. Imamura K, Asano Y, Maruyama Y, Yokoyama T, Nomura M, Ogawa S, Kakanishi K. Characteristics of hydrogen bond formation between sugar and polymer in freeze-dried mixtures under different rehumidification conditions and its impact on the glass transition temperature. *J Pharm Sci*, 2008; 97: 1301-12.
45. Martindale: The complete drug reference:  
<http://medicinescomplete.com/mc/merck/2010/02022.htm> [Acceso 20/10/2015]

46. AHFS: Drug information:  
<http://www.medicinescomplete.com/mc/ahfs/2010/a398026.htm#r3980261> [Acceso 20/10/2015]
47. Estelle F, Simmons R, Simmons K. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *J Allergy Clin Immun*, 2011; 128: 1139-1150.
48. Rihoux JP. Therapeutic index of H1-antihistamines: example of cetirizine. *Ann Allerg Asthma Im*, 1999; 83: 489-492.
49. Spencer CM, Faulds D, Peters DH. Cetirizine: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in selected allergic disorders. *Drugs*, 1993; 46:1055-80.
50. Estelle F, Simmons S. Advances in H1 Antihistamines. *N Engl J Med*, 2004; 351: 2203-17.
51. European Pharmacopoeia, 8th edition (2015):  
<http://online6.edqm.eu.sire.ub.edu/ep807/> [Acceso 20/10/2015, monografía cetirizina dihidrocloruro]
52. Guía Vademecum de medicamentos (España):  
<http://www.vademecum.es/principios-activos-cetirizina-r06ae07> [Acceso 28/10/2015]
53. Himmel MH, Honig PK, Worobec AS. Dangers or non-sedating antihistamines [carta]. *Lancet*, 1997; 350: 69.
54. Dumoulin M, Martin K, Titier K, Molimard M, Moore N. Cardiotoxicité des antihistaminiques de deuxième génération. *Rev Fr Allergol*, 2006; 46: 392-401.
55. Sale ME, Barbey JT, Woosley RL, Edwards D, Yeh J, Thakker K, Chung M. The electrocardiographic effects of cetirizine in normal subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 1994; 56: 295-301.
56. NAPOS: The drug database for porphyria:  
[http://www.drugs-porphyrina.org/languages/UnitedKingdom/s3.php?atc\\_code=R06AE07&l=gb](http://www.drugs-porphyrina.org/languages/UnitedKingdom/s3.php?atc_code=R06AE07&l=gb) [Acceso 20/10/2015]
57. Suñé Negre JM, Roig Carreras M, Fuster García R, Hernández Pérez C, Ruhí Roura R, García Montoya E, Miñarro Carmona M, Pérez Lozano P, Tico Grau JR. Nueva metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación

a su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM. *Cienc Tecnol Pharm*, 2005; 15 (3): 125-136.

58. Pérez Lozano P, Suñé Negre JM, Miñarro M, Roig M, Fuster R, García Montoya E, Hernández C, Ruhí R, Ticó JR. A new expert system (SeDeM Diagram) for control batch powder formulation and preformulation drug products. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006; 64: 351-359.

59. Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Miñarro M, Roig M, Fuster R, Hernández C, Ruhí R, García Montoya E, Ticó JR. Application of the SeDeM Diagram and a new mathematical equation in the design of direct compression tablet formulation. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008; 69: 1029-1039.

60. Aguilar J, García-Montoya E, Pérez-Lozano P, Suñé-Negre JM, Miñarro M, Ticó JR. The use of the SeDeM Diagram expert system to determine the suitability of diluents-disintegrants for direct compression and their use in formulation of ODT. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009; 73: 414-423.

61. García Montoya E, Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Miñarro Carmona M, Ticó Grau JR. Metodología de preformulación galénica para la caracterización de sustancias en relación a su viabilidad para la compresión: Diagrama SeDeM. *Farmespaña Industrial*, 2010; enero/febrero: 58-62.

62. Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Roig M, Fuster R, Hernández C, Ruhí R, García Montoya E, Miñarro M, Ticó JR. Optimization of parameters of the SeDeM Diagram Expert System: Hausner index (IH) and relative humidity (%RH). *Eur J Pharm Biopharm*, 2011; 79: 464-472.

63. Aguilar Díaz JE, García Montoya E, Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Miñarro M, Ticó JR. Predicting orally disintegrating tablets formulation of ibuprofen tablets: An application of the new SeDeM-ODT expert system. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012; 80: 638-648.

64. Saurí J, Millán D, Suñé Negre JM, Pérez Lozano P, Sarrate R, Fábregas A, Carrillo C, Miñarro M, Ticó JR, García Montoya E. The use of the SeDeM diagram expert system for the formulation of Captopril SR matrix tablets by direct compression. *Int J Pharm*, 2014; 461 (1-2): 38-45.

65. Aguilar Díaz JE, García Montoya E, Pérez Lozano P, Suñé Negre JM, Miñarro M, Ticó JR. SeDeM expert system a new innovator tool to develop pharmaceutical forms. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014; 40 (2): 222-236.
66. Suñé Negre JM, García Montoya E, Pérez Lozano P, Aguilar Díaz JE, Roig Carreras M, Fuster García R, Miñarro Carmona M, Ticó Grau JR. SeDeM Diagram: A New Expert System for the Formulations of drugs in Solid Form. En Petrica Vizureanu. *Expert Systems for Human, Materials and Automation*. Editorial InTech. Rijeka (Croatia), 2011: 17-34. ISBN 978-953-307-334-7.
67. Suñé Negre JM. Aplicación del Diagrama SeDeM y nueva ecuación matemática en el diseño y formulación de comprimidos. En Salazar Macián R. *Tertulias tecnológicas con los amigos del profesor Ramon Salazar*. Talleres Gráficos Vigor SA. Barcelona, 2012: 371-394.
68. Suñé Negre JM, Roig Carreras M, Fuster García R, García Montoya E, Pérez Lozano P, Aguilar Díaz JE, Miñarro Carmona M, Ticó Grau JR. SeDeM Diagram: an expert system for preformulation, characterization and optimization of tablets obtained for direct compression. En Aguilar Díaz JE. *Formulations tools for pharmaceutical development*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge (UK), 2013: 109-135.
69. Aguilar Díaz JE, García Montoya E, Pérez Lozano P, Suñé Negre JM, Miñarro Carmona M, Ticó Grau JR. New SeDeM expert system: an expert system for formulation of orodispersible tablets obtained by direct compression. En Aguilar Díaz JE. *Formulations tools for pharmaceutical development*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge (UK), 2013: 137-154.
70. International Conference of Harmonization, ICHQ2B: Validation of Analytical Procedures. Terms and Definitions:  
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>  
[Acceso 20/10/2015]
71. Official methods of analysis of AOAC:  
[http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf) [Acceso 20/10/2015]
72. Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry:  
<https://archemcalc.com/sparc/test/login.cfm> [Acceso 20/10/2015]

73. Pubchem open chemistry database:  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2678>  
[Acceso 20/10/2015]
74. Kim CK, Yeong, KJ, Ban E, Hyun MJ, Kim JK, Jin SE, Park JS: Narrow-bore high performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine in human plasma using column switching J Pharm Biomed Anal, 2005; 37:603-609.
75. El Walily AFM, Korany MA, El Gindy A, Bedair MF: Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of cetirizine dihydrochloride in pharmaceutical tablets. J Pharm Biomed Anal, 1998; 17:435-442.
76. Dharuman J, Vashudevan M, Ajithlal T: High performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine and ambroxol in human plasma and urine— a boxcar approach. J Chromatogr B, 2011; 879:2624-2631.
77. Rocha-Selmi GA, Theodoro AC, Thomazini M, Bolini HMA, Favaro-Trindade CS. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of a sweetener sucralose. J Food Eng, 2013; 119: 28-32.
78. Abraham J, Mathew F. Taste masking of paediatric formulation: review on technologies, recent trends and regulatory aspects. Int J Pharm Pharm Sci, 2014; 6: 12-19.
79. International Conference of Harmonization, ICHQ1A (R2):  
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>  
[Acceso 20/10/2015]
80. Preis M, Grotherc L, Axec P, Breitzkreutz J. In-vitro and in-vivo evaluation of taste-masked cetirizine hydrochloride formulated in oral lyophilisates. Int J Pharm, 2015; 491: 8–16.

**ANEXO 1**



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Determination of stress-induced degradation products of cetirizine dihydrochloride by a stability-indicating RP-HPLC method

Paloma Flórez Borges<sup>1,2\*</sup>, Pilar Pérez Lozano<sup>1†</sup>, Encarna García Montoya<sup>1†</sup>, Montserrat Miñarro<sup>1†</sup>, Josep R Tico<sup>1†</sup>, Enric Jo<sup>2†</sup> and Josep M Suñe Negre<sup>1†</sup>

## Abstract

**Background:** A new, simple and accurate stability-indicating reverse phase high performance liquid chromatography method was developed and validated during the early stage of drug development of an oral lyophilizate dosage form of cetirizine dihydrochloride.

**Methods:** For RP-HPLC analysis it was used an Eclipse XDB C8 column 150 mm × 4.6 mm, 5 μm (Agilent columns, Barcelona, Spain) as the stationary phase with a mobile phase consisted of a mixture of 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.00 and acetonitrile (65:35, v/v) at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Detection was performed at 230 nm using diode array detector. The method was validated in accordance with ICH guidelines with respect to linearity, accuracy, precision, specificity, limit of detection and quantification.

**Results:** The method results in excellent separation between the drug substance and its stress-induced degradation products. The peak purity factor is >950 for the drug substance after all types of stress, which confirms the complete separation of the drug substance peak from its stress induced degradation products.

Regression analysis showed  $r^2 > 0.999$  for cetirizine dihydrochloride in the concentration range of 650 μg mL<sup>-1</sup> to 350 μg mL<sup>-1</sup> for drug substance assay and a  $r^2 > 0.999$  in the concentration range of 0.25 μg mL<sup>-1</sup> to 5 μg mL<sup>-1</sup> for degradation products. The method presents a limit of detection of 0.056 μg mL<sup>-1</sup> and a limit of quantification of 0.25 μg mL<sup>-1</sup>. The obtained results for precision and accuracy for drug substance and degradation products are within the specifications established for the validation of the method.

**Conclusions:** The proposed stability-indicating method developed in the early phase of drug development proved to be a simple, sensitive, accurate, precise, reproducible and therefore useful for the following stages of the cetirizine dihydrochloride oral lyophilizate dosage form development.

## Background

In the early stage of drug development, forced degradation studies are used to facilitate the development of an analytical methodology, in order to obtain a better understanding of the drug substance (DS) studied and the final drug product (DP) stability, providing data regarding degradation pathways and degradation products (DE) [1]. Such studies are needed to assure that all

the regulatory requirements of a drug are fulfilled, such as the identification of possible DE, degradation pathways and intrinsic stability of the drug molecule. Part of the study is the development and validation of the stability indicating analytical method involved [2,3]. The overall objective of this work is to develop a new formulation with the drug substance (C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) cetirizine dihydrochloride (CTZ; the dihydrochloride of a 2-[4-chlorobenzhydryl] piperazin-1-yl] ethoxyacetic acid). CTZ is a non-sedative H<sub>1</sub> antihistaminic drug, a piperazine derivative and metabolite of hydroxyzine (Figure 1) [4]. CTZ presents an increased degree of polarity, which makes it less capable of crossing the blood brain barrier, hence reducing the sedative side effects in comparison

\* Correspondence: pflorezb@gmail.com

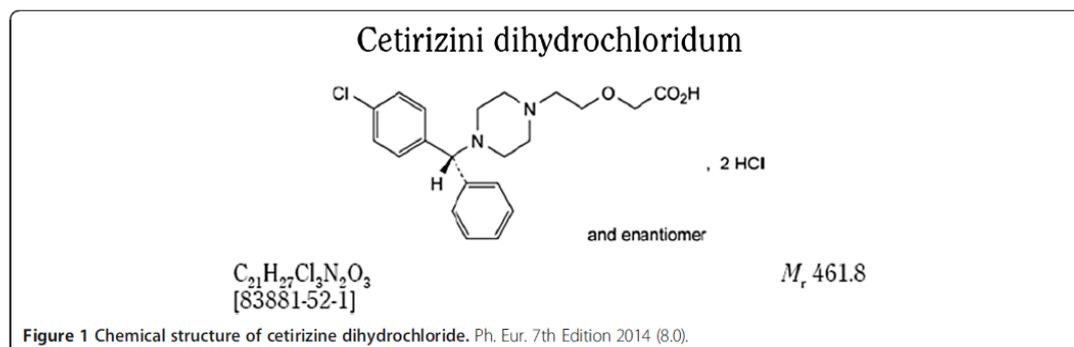
†Equal contributors

<sup>1</sup>Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda Joan XXIII s/n 08028, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Reig Jofre Group, c. Gran Capitá 6 08970, Sant Joan Despí, Barcelona, Spain



© 2014 Flórez Borges et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



with first generation antihistamines, such as diphenhydramine and hydroxyzine [5-7]. CTZ is administered generally in tablets and liquid forms orally to promote the relief of symptoms related to allergic rhinitis, chronic idiopathic urticaria and other rashes [8,9].

This new formulation consists of an oral lyophilized dosage form, whose aim is to facilitate swallowing (in the case of patients with dysphagia, such as children and elderly, for instance), easy to administer, effective, safe and stable over time.

Several HPLC methods have been reported in literature for the determination of CTZ alone [10-13] and also determining CTZ simultaneously with other drug substances, as in multicomponents preparations [14-16]. In order to develop a new chromatographic method for the determination and quantification of CTZ and its DE generated after a forced degradation study, several chromatographic methods for CTZ were investigated in the literature. Among them, was the Ph. Eur. method for CTZ [17]. However, the latter was discarded due to the use of a normal phase chromatographic column and mobile phase that used much organic solvent (acetonitrile, not very cost-effective). Also, the Ph. Eur. method presents a very acid mobile phase pH (pH <0.5), which is known to diminish the life span of the chromatographic column [18]. Also, some chromatographic analytical methods [12,13] used chromatographic columns of reverse phase, usually C18 and C8. Depending on the type of separation pursued (as for instance, CTZ combined with another DS), isocratic or gradient methods were used, and also mobile phases with ionic pairing. We have developed a reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method by studying the effect of the stationary phase (C18 or C8 analytical columns) on peak resolution, the influence of pH -mobile phase-when adjusting the desired retention time ( $t_R$ ) for the DS. Plus, by using a reverse-phase column, we reduced the amount of organic solvent (acetonitrile) used for the

identification of the DS, in comparison to the analytical method validated by Ph. Eur. [17], which uses a normal phase chromatographic column, requiring more organic solvent due to its characteristics [18-25]. Therefore the aim of this study is to determine all possible DE generated under stress conditions, by developing and validating a stability-indicating RP-HPLC method for cetirizine dihydrochloride in the early stage of drug development of an oral lyophilizate.

## Methods

### Chemicals and reagents

All chemicals were analytical grade and used as received. All solutions were prepared in Milli-Q deionized water from a Milli Q gradient A10 water purification system (Molsheim, France). CTZ bulk powder (Cetirizine dihydrochloride, Ph. Eur) was purchased from Jubilant Lifesciences Ltd (Mysore, India) and kindly provided by Reig Jofre Group (Barcelona, Spain). HPLC grade acetonitrile was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Ortho-phosphoric acid 85% was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Potassium phosphate dibasic Ph. Eur. ( $K_2HPO_4$ ) was purchased from Fagron (Terrasa, Spain). Hydrochloric acid 37%, sodium hydroxide and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) at 33% were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

### Equipment and chromatographic conditions

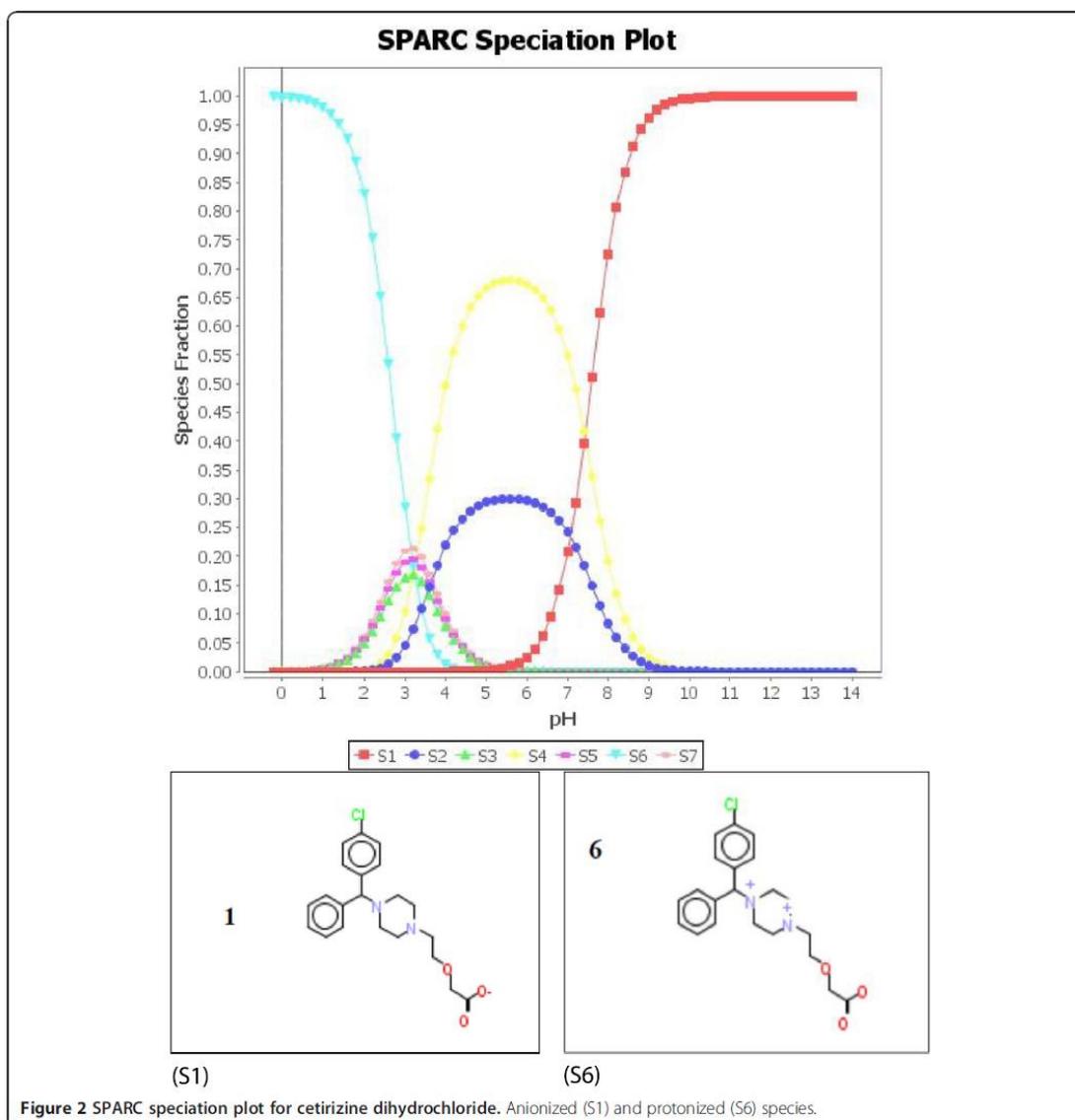
Samples were analyzed on Dionex Ultimate 3000 HPLC Thermo Fisher Scientific (California, USA), equipped with data system Chromeleon version 6.8 SP2 Build 2284, with degasifier SR3000, LPG-3400 quaternary pump, injector WPS3000, oven 6P TCC-3100, UV-vis detector PDA-3000. For initial development studies it was used an analytical chromatographic column Kromasyl 100-5C18 150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size (Tecnokroma Akzonobel, Terrasa, Spain). For final development and method validation, it was used an analytical

chromatographic column Eclipse XDB-C8 150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size (Agilent columns, Barcelona, Spain). An isocratic mobile phase consisting of acetonitrile and 0.2 M potassium phosphate dibasic Ph. Eur. buffer solution at pH 7.00 (35:65 v/v) was used, and the analysis was carried out at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. All determinations were performed at 30°C. The injection volume was 25 μL. The detector was set at λ 230 nm. The peak homogeneity was expressed in terms of peak purity factor and was obtained directly from spectral analysis report using the above mentioned software. Other apparatus included a Crison micropH 2002 pH

meter (Barcelona, Spain) and Heraeus oven T5028 for thermal degradation (dry heat at 105°C) (Hanaus, Germany).

#### Forced degradation studies and preparation of samples

The forced degradation studies were carried out by preparing several standard solutions of CTZ at 500 μg mL<sup>-1</sup>, for each degradation study. Each sample was analyzed according to the previous procedures described under the proposed analytical method. In order to determine whether the analytical method is suitable to be a stability-indicating



assay, forced degradation studies under different conditions were carried out according to the following procedure:

- a) Acid and basic hydrolysis: 5 mg of bulk powder was treated with 5 mL of 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH. The flasks were placed in a dry air oven at 105°C. Another 5 mg of bulk powder was also treated with 5 mL of 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH at room temperature, for 24 hours.
- b) Oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 33%: 5 mg of bulk powder was exposed to 5 mL of hydrogen peroxide at 33% (W/v). The vial was kept at room temperature for 24 hours.
- c) Infrared (IR) and Ultraviolet (UV) light: 5 mg of bulk powder was exposed under an infrared lamp and another 5 mg of bulk powder was exposed under an ultraviolet lamp, for 24 hours.
- d) Humidity HR 79%: the 5 mg bulk powder sample was placed inside a humidifier with HR 79%, for 24 hours.
- e) Heat at 105°C: 5 mg of bulk powder sample was placed inside a 105°C dry air oven for 24 hours.
- f) Shed sunlight for 15 days: 5 mg of bulk powder was kept in a vial for 15 days, at room temperature and exposed to direct sunlight.

Once the stress conditions were complete, 10 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.00) was added to the samples in order to achieve the standard solution concentration of 500 µg mL<sup>-1</sup>. Moreover, all the solutions and blanks were filtered with a 0.45 µm syringe filtration disk

PVDF. Results were compiled in terms of relative retention times (rtR) found during the analysis.

#### Validation of the analytical method

In order to validate the RP-HPLC method developed, ICHQ2B guideline recommendations were followed, in terms of selectivity, linearity, range, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) [26]. In order to fulfill ICH specifications in terms of linearity and range for the analytical method (content uniformity and assay of DS and finished product), a linear range within 70-130% was studied, by analyzing a series of three replicates, i.e., three independent sets (k = 3), each with seven different concentrations (n = 6): 350 µg mL<sup>-1</sup> - 650 µg mL<sup>-1</sup>, considering 500 µg mL<sup>-1</sup> as 100% (standard solution), in order to provide information on the variation in peak area values between samples of the same concentration. For evaluation of the precision estimates, repeatability and intermediate precision were performed at three concentration levels (650, 500 and 350 µg mL<sup>-1</sup>, corresponding to 130, 100 and 70%), and 10 injections of each sample (K = 10), per day. Mean average, standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) of t<sub>R</sub> and the peak area achieved individually of day 1 and 2 were calculated. After the HPLC analysis, the response factor (RF) was calculated between the response (Y) and concentration achieved (X), as Y/X. Therefore, mean average, SD and RSD were calculated using the response factors obtained with an Excel 2007 spread sheet. The response factors results must comply with a RSD ± 2%. For accuracy the concentration found expressed by function of repeatability of the standard

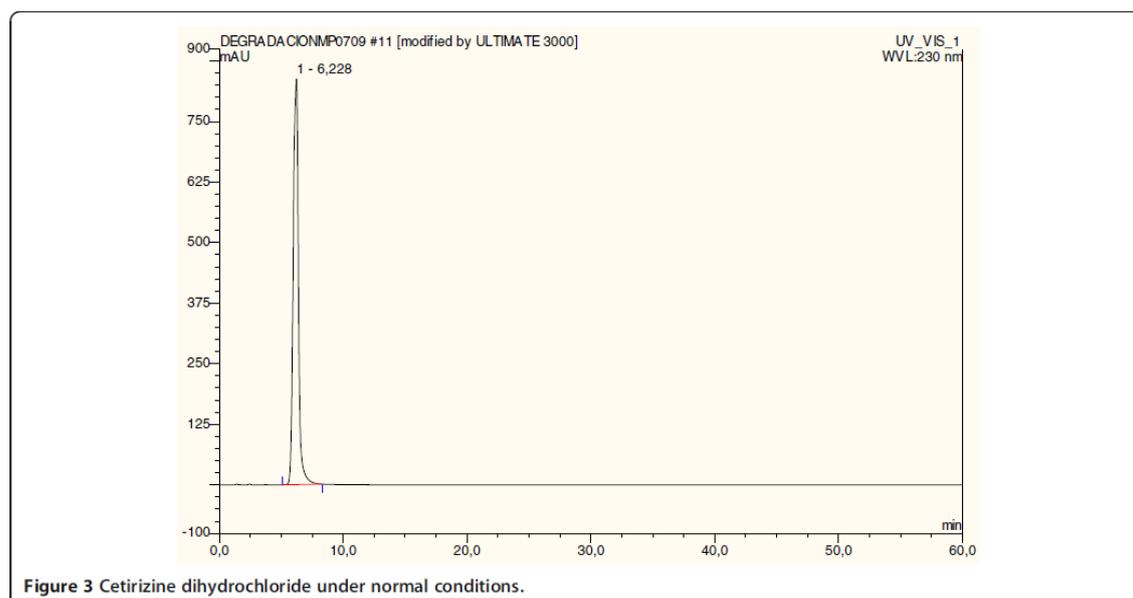


Figure 3 Cetirizine dihydrochloride under normal conditions.

**Table 1 Summary of product degradation peaks in relative retention time (rt<sub>R</sub>)**

Stress conditions	rt <sub>R</sub> (min)		CTZ											
Humidity HR79%			1.00											
Acid hydrolysis *RT	0.51		0.81 0.87 1.00											
Acid hydrolysis at 105°C	0.46	0.50	0.64	0.87 1.00 5.00										
Ultraviolet light (UV)	0.52 0.59		0.81 1.00 2.00 4.30											
Infrared light (IR)	0.51 0.60		0.66 0.81 1.00											
Basic hydrolysis *RT	0.53		0.81 0.87 1.00											
Basic hydrolysis at 105°C	0.46	0.48	0.51 0.58	0.71	0.86	1.00	1.60	2.00	2.80	3.40	5.00	9.10		
Dry heat at 105°C	0.50		0.72 0.80 0.90 1.00 4.30 5.00											
Shed sunlight 15 days	0.60		1.00											
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> at 33%	0.51		1.00 1.90 2.60 4.40 5.70											
Normal conditions			1.00											

\*RT: Room temperature.

solution, relative error in percentage and the percentage of recovery, with mean average, SD and RSD deviation of each of the three concentrations studied (650, 500 and 350 µg ml<sup>-1</sup>, was considered of three replicates) were calculated. For the DS, 98-102% percentage of recovery was considered as being acceptable [27].

For the determination and quantification of the DE, linearity, precision, accuracy and LOD and LOQ were calculated. In order to carry out this validation, further dilutions from a stock solution of 500 µg ml<sup>-1</sup> with the specified mobile phase were carried out in order to achieve the correspondent concentrations: 5 µg mL<sup>-1</sup>, 2.5 µg mL<sup>-1</sup>, 1.25 µg mL<sup>-1</sup>, 0.5 µg mL<sup>-1</sup>, 0.25 µg mL<sup>-1</sup>, 0.125 µg mL<sup>-1</sup>. A total of seven independent calibration curves, i.e., seven replicates (k = 7) were prepared. The LOD and LOQ were calculated by the ratio between the standard deviation of y-intercepts of regression lines of the seven calibration curves mentioned before by averaging the slopes of calibration curve multiplied by 3.3 and

10, respectively [26,27]. Each serial dilution (k = 7) was analyzed, with n = 6 (level of concentrations).

In terms of relative error and percentage of recovery three concentrations (5, 1.25 and 0.25 µg mL<sup>-1</sup>) from the range of DE were evaluated. All the solutions prepared were filtered with a 0.45 µm syringe filtration disk PVDF to the vials for injection in the HPLC system.

## Results and discussion

### HPLC method development

As an early stage study of drug development, our goal was to acknowledge all possible DE generated under stress conditions for CTZ. The information acquired in the early stage of the study will lead us to a better understanding of the DS itself and also the possible DE that we may find during the next step of the oral lyophilized development study. Therefore it was not our objective the development of a fast analytical method for the DS per se, but actually the development of an analytical

**Table 2 Peak purity determination by diode-array UV-vis spectra of CTZ and stress studies results**

Forced degradation conditions	<sup>a</sup> Peak purity index match	Decomposition (%)	Extent of decomposition
Humidity HR79%	952	0	None
Acid hydrolysis *RT	990	0	None
Acid hydrolysis at 105°C	998	19	Substantial
Ultraviolet light (UV)	962	9	Substantial
Infrared light (IR)	962	8	Substantial
Basic hydrolysis *RT	972	0	None
Basic hydrolysis at 105°C	986	15	Substantial
Dry heat at 105°C	953	3	Substantial
Shed sunlight 15 days	996	10	Substantial
Oxidative medium *RT	998	79	Substantial
CTZ (phosphate buffer solution)	990	0	Normal conditions

<sup>a</sup>indicates the value for peak purity index match of CTZ above 950, considering 1000 as 100% match; \*RT: Room temperature.

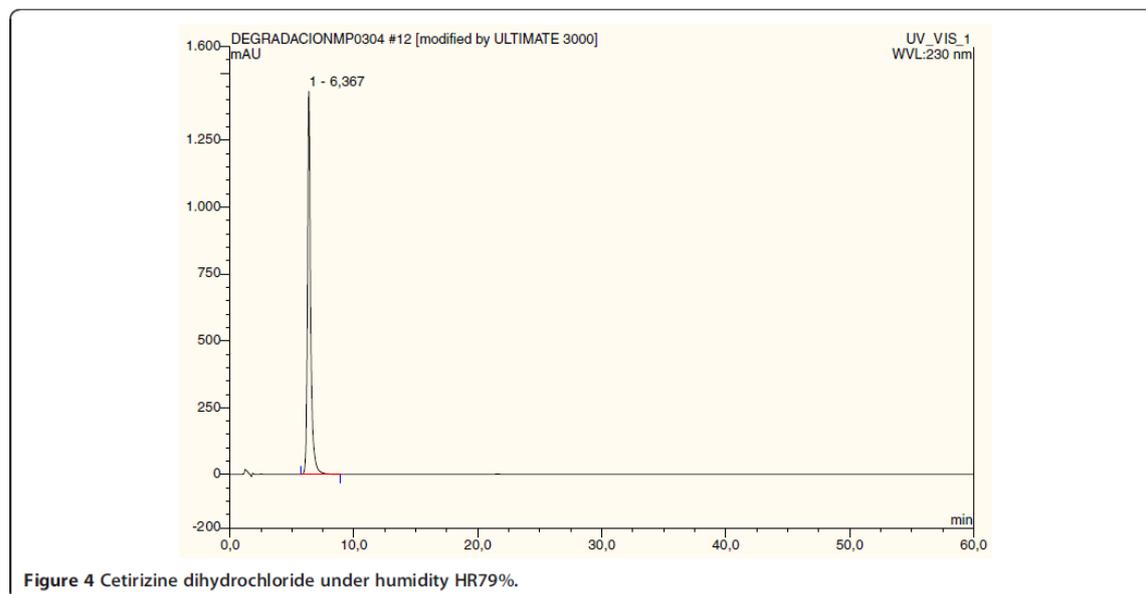


Figure 4 Cetrizine dihydrochloride under humidity HR79%.

method that could detect a complete profile of DE for this DS, leaving for the following studies of drug development the aim of reducing run time, for instance.

CTZ is freely soluble in water, and practically insoluble in acetone and metilen chlorate [17]. Considering its hydrophilic nature, reverse phase columns were chosen in order to investigate the chromatographic profile with two types of packing material for stationary phases: C18 (more hydrophobic, octadecylsilyl), and C8 (intermediate hydrophobicity, octylsilyl). We also studied the molecule

of CTZ using the physicochemical calculator SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) developed by the United States Environmental Protection Agency (EPA) for the purpose of predicting which pH would suit best for CTZ ionization [28]. The speciation plot for CTZ (Figure 2) shows that pH3 is not recommended for the ionization of CTZ due to the existence of six different species of ionized CTZ with no clear definition among them, whereas at pH2 we can find the protonated CTZ (S6) and at pH7 the anionized

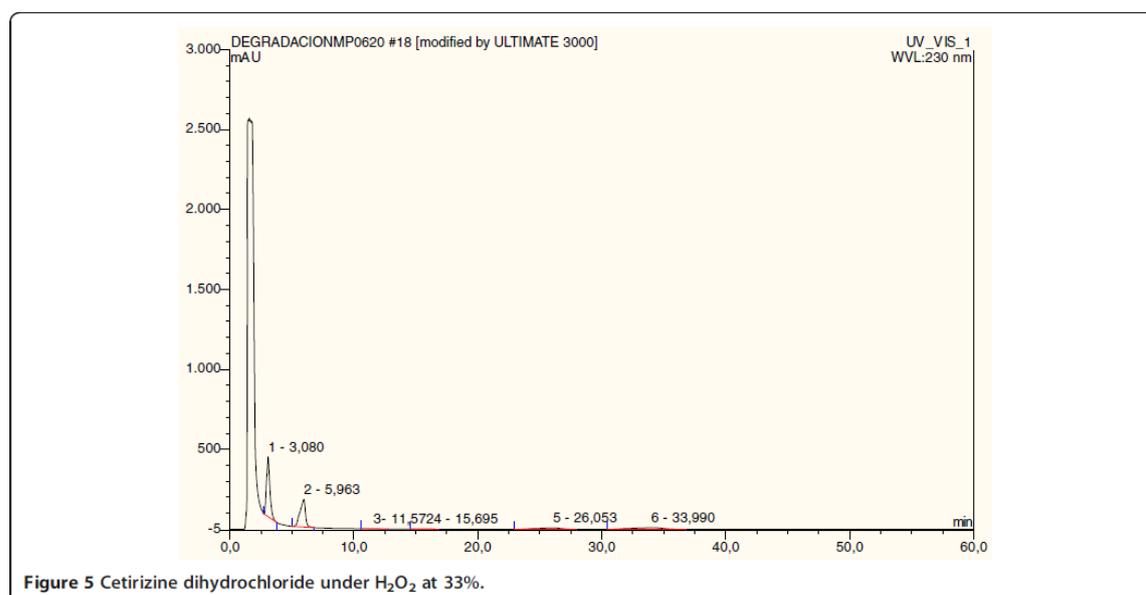
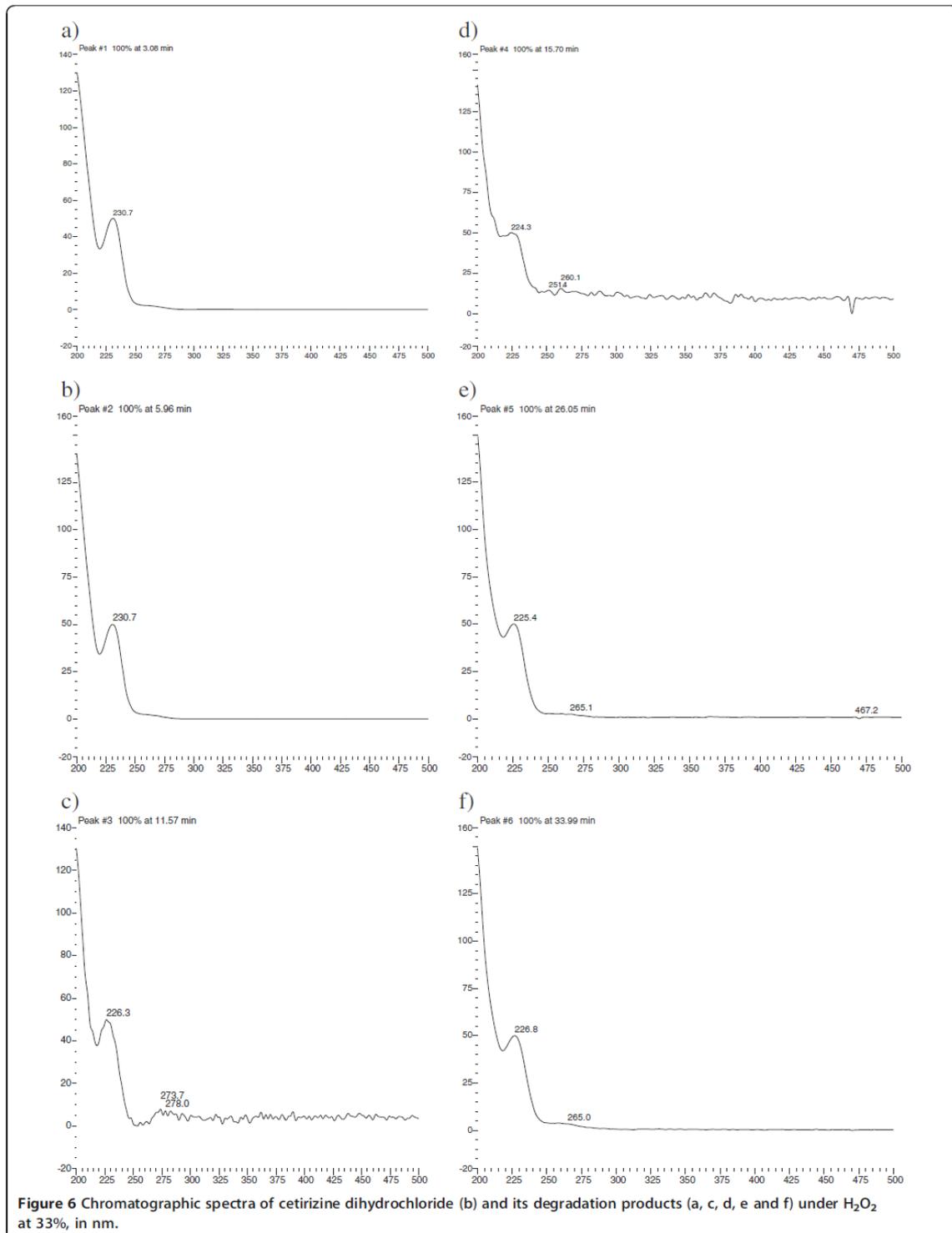


Figure 5 Cetrizine dihydrochloride under  $H_2O_2$  at 33%.



**Table 3 Repeatability and intermediate precision according to retention time ( $t_R$ ) and peak area for CTZ assay**

Day	$t_R$	Peak area			
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Mean average $\pm$ $^a\text{SD}$ (min) $^b\text{K} = 10$	$^c\text{RSD}$ (%)	Mean average $\pm$ $^a\text{SD}$ (mAU.min) $^b\text{K} = 10$	$^c\text{RSD}$ (%)
1	650	5.79 $\pm$ 0.0274	0.4747	512.54 $\pm$ 1.7865	0.5365
	500	5.79 $\pm$ 0.0327	0.5646	399.69 $\pm$ 1.9090	0.4777
	350	5.80 $\pm$ 0.0228	0.3929	281.21 $\pm$ 1.7867	0.6353
2	650	5.77 $\pm$ 0.0195	0.3384	511.75 $\pm$ 2.2059	0.4310
	500	5.78 $\pm$ 0.0149	0.2584	399.54 $\pm$ 1.5972	0.3997
	350	5.80 $\pm$ 0.0248	0.4279	281.63 $\pm$ 1.0483	0.3722

$^a\text{SD}$  (Standard deviation);  $^b\text{K}$  (number of injections);  $^c\text{RSD}$  (Relative standard deviation).

CTZ (S1) (Figure 3). The pKa values estimated for CTZ are: 2.7 (pKa1), 3.6 (pKa2) and 7.6 (pKa 3) [29]. However, due to the finding of chromatographic methods that used buffer solutions at pH3 or around 3 (2.8, 3.5, for instance) we decided to consider pH3 in our study [10-12,14]. During the preliminary studies of the analytical method development, we have combined different proportions of acetonitrile and aqueous solution at pH3 (MilliQ water acidified at pH3 with orto-phosphoric acid 85%). The preliminary studies were carried out by the injection of a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solution of CTZ, using a C18 analytical chromatographic column, flow rate of mobile phase of 1  $\text{mL min}^{-1}$ , an injection volume of 25  $\mu\text{L}$ , oven temperature of 30°C, 230 nm of wavelength, in isocratic mode. The effects of the optimum eluent composition were studied, obtaining a retention time ( $t_R$ ) of eight minutes for CTZ with a 35:65 (v/v) of acetonitrile and aqueous solution at pH3. Also, we tried to adjust the mobile phase –studying the effect of the proportion between the organic solvent and buffer solution pH– in order to achieve a  $t_R$  of approximately 6–7 for CTZ. To diminish the  $t_R$ , we finally tried to use a buffer solution of 0.2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH7. We observed that maintaining the same proportions of organic solvent and buffer solution, but changing the pH from 3 to 7, using potassium phosphate dibasic buffer solution at 0.2 M

solution at pH7, we achieved a  $t_R$  of 5–6 minutes. However, CTZ peak shape presented tail broadening. Therefore, in order to avoid using ion pair to improve peak resolution, we have changed the analytical chromatographic column C18 (Kromasyl 100–5 C18) to a C8 (Eclipse XDB C8), and tested with the same conditions as before: acetonitrile and phosphate buffer solution pH 7 (35:65, respectively), injection volume 25  $\mu\text{L}$ , flow rate 1  $\text{mL min}^{-1}$ , temperature 30°C, 230 nm of wavelength. This resulted in eliminating tail broadening. Having determined the eluent proportions of the isocratic mobile phase and the pH of the aqueous solution as pH7, obtaining the desired  $t_R$ , we have established the stability-indicating method to carry out the forced degradation studies.

#### Results of forced degradation study

CTZ was degraded up to 19% under acid hydrolysis at 105°C, presenting five degradation peaks. Under basic hydrolysis at 105°C, CTZ was degraded up to 15%, presenting twelve degradation peaks, followed by shed sun light (10%, one degradation peak), UV (9%, four degradation peaks), IR (8%, four degradation peaks) and dry heat at 105°C (3%, 6 degradation peaks). CTZ under photolytic stress -shed sunlight during 15 days, IR and UV light- presented degradation peaks with two, four

**Table 4 Concentrations found, relative error in percentage, percentage of recovery and estimates for CTZ assay**

$^a$ Theoretical concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentration found ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Relative error%	$^b$ Recovery%	Mean recovery	$^c\text{SD}$ of recovery
650	641.29	1.25	98.75	98.66	0.09
650	641.27	1.36	98.65		
650	640.67	1.45	98.56		
500	500.96	0.19	100.19	100.49	0.57
500	500.71	0.14	100.14		
500	505.80	1.14	101.16		
350	352.16	0.61	100.61	100.95	0.43
350	352.77	0.78	100.79		
350	355.05	1.42	101.44		

$^a$ 650  $\mu\text{g mL}^{-1}$  = 130%, 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  = 100%, 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$  = 70%;  $^b$ recovery limits (98-102%);  $^c\text{SD}$  (Standard deviation).

**Table 5 Mean average, standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD%) of peak area mAU (5 – 0.125  $\mu\text{mL}^{-1}$ )**

Theoretical concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mean concentration average $\pm$ <sup>a</sup> SD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( <sup>b</sup> k = 7)	<sup>c</sup> RSD (%)
5.000	4.0495 $\pm$ 0.1040	2.5701
2.500	2.0121 $\pm$ 0.0251	1.2502
1.250	1.0012 $\pm$ 0.0326	3.2622
0.500	0.4021 $\pm$ 0.0327	8.1334
0.250	0.1818 $\pm$ 0.0111	6.1605

<sup>a</sup>SD (Standard deviation); <sup>b</sup>k (number of replicates); <sup>c</sup>RSD (relative standard deviation).

and five peaks, respectively (Table 1). CTZ presented DE peaks under acid (three DE peaks) and basic hydrolysis at room temperature (three DE peaks). However, degradation was not substantial in both cases (Table 2). Comparing the chromatographic profile of CTZ dissolved in buffer solution (Figure 3) with no stress conditions (normal conditions) with CTZ under Humidity HR79% (Figure 4), it is observed that CTZ showed no substantial degradation under Humidity HR79%, presenting a similar chromatographic profile with CTZ dissolved in buffer solution at the same concentration. Under oxidative stress, CTZ presented 79% of degradation, showing five degradation peaks (Figure 5) and in Figure 6 it can be visualized by the chromatographic spectra of each DE and CTZ. Furthermore, the peak purity value for CTZ under oxidative stress was of 998 (considering 1000 as 100% match), indicating a homogenous peak (Table 2). However, in the beginning of the elution process, the diode-array assay detects DE higher than its threshold, demonstrating a possible saturation of the chromatographic column with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 33%. There is also the hypothesis that 79% of decomposition can also be the result of the degradation of DE, which would generate more DE, due to the exposure of CTZ during 24 hours under oxidative condition. This leads to the conclusion that may be necessary to change the oxidative stress condition procedure, by reducing the concentration of peroxide (33%) or reducing the time of exposure of the DS with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (24 hours), or both. Satisfactory results were obtained studying the peak purity

**Table 6 Relative error (%) and percentage of recovery**

Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mean concentration found ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( <sup>a</sup> k = 7)	<sup>b</sup> Relative error% (mean)	<sup>c</sup> Mean Recovery%	<sup>d</sup> SD of recovery%
5	5.000	0.620	100.070	0.74
1.25	1.248	3.310	99.840	4.10
0.25	0.235	9.390	94.210	10.00

<sup>a</sup>k = 7 (number of replicates); <sup>b</sup>mean relative error%; <sup>c</sup>mean recovery%; <sup>d</sup>standard deviation.

index for CTZ under stress conditions, which confirms the high specificity of the analytical method for CTZ (Table 2).

#### Method validation

The developed method was validated using ICH guidelines [26]. Validation parameters included linearity, precision, accuracy, precision, and specificity, LOD and LOQ [26,27].

#### Assay for drug substance method

Linearity for CTZ assay was verified by triplicate analysis of seven different concentrations, i.e., three sets of 130–70% range of CTZ. As a result, the linear regression equation was found to be  $Y = 769.56 X + 14.573$  ( $r^2 = 0.9994$ ,  $k = 3$  (number of replicates),  $n = 7$  (level of concentrations),  $650 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for CTZ. In which, Y was the dependent variable, X was independent variable, 769.56 was the slope and which showed change in dependent (Y) variable per unit change in independent (X) variable; 14.573 was the Y-intercept i.e., the value of Y variable when  $X = 0$ .

As for the analytical method precision (Table 3), three concentration levels (650, 500 and  $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ , corresponding to 130, 100 and 70%), and 10 injections of each sample, per day were prepared. The results have shown the repeatability and intermediate precision presenting a RSD inferior to 2.7% according to AOAC [27] (1.43% and 1.03%, respectively). In terms of accuracy, according to the obtained results (Table 4), the percentage of recovery ranges from 98.56 to 101.44, from being within the limits established according to AOAC [27] (98–102%), which indicates the accuracy of the method for CTZ.

It was studied seven independent sets of dilutions, i.e., seven replicates ( $k = 7$ ), each set with six different concentrations ( $n = 6$ ) in the range of  $5\text{--}0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Calculating LOD and LOQ by the ratio between the SD of y-intercepts of regression lines of the seven serial dilutions of six different concentrations mentioned before by averaging the slopes of calibration curve multiplied by 3.3 and 10, respectively, the analytical method presented a LOD of  $0.056 \mu\text{g mL}^{-1}$  and a LOQ of  $0.17 \mu\text{g mL}^{-1}$ . However, it was demonstrated that the LOQ value of  $0.17 \mu\text{g mL}^{-1}$  was not linear. Therefore, taken into account the range defined in ICH guidelines to the DE, for linearity reasons it was considered the range around a suggested (probable) limit [26]. Therefore, the linearity should be established from the LOQ to 120%. So a new LOQ (SD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 0.0111, RSD (%) = 6.1605) was established ( $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The linear regression equation was found to be  $Y = 0.8125X - 0.014$  ( $r^2 = 0.9999$ ,  $n = 5$  (level of concentrations),  $k = 7$  (number of replicates),  $0.25\text{--}5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Table 5).

In reference to the results of the analytical method validation, in both Table 5 (repeatability) and Table 6

(recovery), the RSD and the range complies with RSD permitted (2.7%) and the range (90–110%) according to AOAC [27], assuring the applicability of the developed analytical method for the determination and quantification of DE.

### Conclusions

A new and simple RP-HPLC method was developed for the determination of CTZ and its DE during the early stage of drug development of an oral lyophilized dosage form. The proposed method was demonstrated to be linear, precise, accurate and specific, based on method validation. Satisfactory results were obtained in separating the peak of CTZ from the DE produced by forced degradation. Plus, it is a cost-effective method that requires a simple mobile phase (phosphate buffer solution and acetonitrile, 65:35 v/v) and also does not require the use of ion pairing, which can result in difficulty in recovering initial column properties. It was also able to separate with good specificity the DS peak from the entire DE generated during the stress condition study, which help us in the next step of the drug development of the oral lyophilizate, by adapting the validated method considering further aspects, such as the interactions between CTZ and the excipients chosen for the final medicinal product. The proposed analytical method proved to be stability-indicating and therefore useful in the following stages of drug development.

### Abbreviations

DS: Drug substance; DP: Drug product; DE: Degradation products; CTZ: Cetirizine dihydrochloride; RP-HPLC: Reverse phase high performance liquid chromatography;  $t_R$ : Retention time;  $r_{T,R}$ : Relative retention time; LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantification; IR: Infrared light; UV: Ultraviolet light.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

PFB, PPL and EGM: participate in method development and optimization, perform the experiments for forced degradation studies and method validation, collect experimental data and write the manuscript. JMSN and EJ: propose and supervise the implementation of various experiments and revised the manuscript. JRT and MM: revised data and supervised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 16 October 2014 Accepted: 2 December 2014

Published online: 09 December 2014

### References

- Ahuja S: Overview of HPLC Method Development for Pharmaceuticals. In *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Edited by Ahuja S, Rasmussen HT. Amsterdam: Academic Press; 2007:1–17.
- Rasmussen HT, Swinney KA, Gaiiki S: HPLC Method Development in Early Phase Pharmaceutical Development. In *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Edited by Ahuja S, Rasmussen HT. Amsterdam: Academic Press; 2007:353–371.
- Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y: The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv Drug Deliv Rev* 2007, 59(1):29–37.
- Sweetman SC: Martindale: the complete drug reference: [https://www.medicinescomplete.com/mc/martindale/current/]
- Simons FER: Advances in H1-antihistamines. *N Engl J Med* 2004, 351:2203–2217.
- Atkins PC, Zweiman B, Moskowitz A, von Allmen C, Ciliberti M: Cellular inflammatory responses and mediator release during early developing late-phase allergic cutaneous inflammatory responses: effects of cetirizine. *J Allergy Clin Immunol* 1997, 99:806–811.
- Walsh GM, Annunziato L, Frossard N, Knol K, Levander S, Nicolas JM, Tagliatela M, Tharp MD, Tillemant JP, Tillemant H: New insights into the second generation antihistamines. *Drugs* 2001, 61:207–236.
- Ortonne JP: Urticaria and its subtypes: the role of second-generation antihistamines. *Eur J Intern Med* 2012, 23:26–30.
- Komarow HD, Metcalfe DD: Office-based management of urticaria. *Am J Med* 2008, 121:379–384.
- Kim CK, Yeong KJ, Ban E, Hyun MJ, Kim JK, Jin SE, Park JS: Narrow-bore high performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine in human plasma using column switching. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 37:603–609.
- Zaater MF, Tahboub YR, Najib NM: RP-LC method for the determination of cetirizine in serum. *J Pharm Biomed Anal* 2000, 22:739–744.
- El Wailly AFM, Korany MA, El Gindy A, Bedair MF: Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of cetirizine dihydrochloride in pharmaceutical tablets. *J Pharm Biomed Anal* 1998, 17:435–442.
- Macek J, Ptáček P, Klíma J: Determination of cetirizine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1999, 736:231–235.
- Dharuman J, Vashudevan M, Ajithlal T: High performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine and ambroxol in human plasma and urine—a boxcar approach. *J Chromatogr B* 2011, 879:2624–2631.
- Likar MD, Mansour HL, Harwood JW: Development and validation of a dissolution test for a once-a-day combination tablet of immediate-release cetirizine dihydrochloride and extended-release pseudoephedrine hydrochloride. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 39:543–551.
- Hadad GM, Emara S, Mahmoud WMM: Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. *Talanta* 2009, 79:1360–1367.
- European Pharmacopoeia 7th Edition 2014 (8.0): [http://online6.edqm.eu/ep801/]
- Jaber AMY, Al Sherife HA, Al Omari MM, Badwan AA: Determination of cetirizine dihydrochloride, related impurities and preservatives in oral solution and tablet dosage forms using HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 2004, 36:341–350.
- Karakuş S, Küçükgüzel I, Küçükgüzel SG: Development and validation of a rapid RP-HPLC method for the determination of cetirizine or fexofenadine with pseudoephedrine in binary pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 2008, 46:295–302.
- Neue UD, Alden BA, Grover R, Grumbach ES, Iraneeta PC, Méndez A: HPLC Columns and Packings. In *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Edited by Ahuja S, Rasmussen HT. Amsterdam: Academic Press; 2007:45–83.
- Visky D: Column Characterization and Selection. In *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*, Volume 8. Edited by Ahuja S, Rasmussen HT. Amsterdam: Academic Press; 2007:85–109.
- Bosch E, Espinosa S, Rosés M: Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A* 1998, 824:137–146.
- Bosch E, Espinosa S, Rosés M: Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography IX. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A* 2002, 947:47–58.
- Espinosa S, Bosch E, Rosés M: Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography 14. Acid-base pK values in acetonitrile-water mobile phases. *J Chromatogr A* 2002, 964:55–66.
- Agrafiotou P, Ràfols C, Castells C, Bosch E, Rosés M: Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. *J Chromatogr A* 2011, 1218:4995–5009.

26. International Conference on Harmonization, ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Terms and Definitions. Step 5 (1996) [<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>]
27. Official methods of analysis of AOAC [<http://www.eoma.aoac.org/>]
28. Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry [<http://archemcalc.com/sparc/>]
29. Pubchem Open chemistry database [<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2678?from=summary#section=Top>]

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





**ANEXO 2**



# Preliminary studies of formulation development of an oral lyophilisate



Paloma Flórez Borges, Pilar Pérez Lozano, Encarna García Montoya, Montserrat Miñarro, Josep R. Tico, Enric Jo and Josep M. Suñe Negre

Universitat de Barcelona  
Faculty of Pharmacy  
Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department  
Av. Joan XXIII s/n, Barcelona. 08028, Spain

## Introduction

Oral lyophilisates are solid preparations intended either to be placed in the mouth or to be dispersed (or dissolved) in water before administration. They are obtained by freeze-drying (lyophilisation). The presence of metastable state and the glass transition temperature ( $T_g$  °C) are two important aspects when formulating a freeze drying product. The metastable state indicates the presence of polymorphism, which can alter the stability of the system. The  $T_g$  °C can help us design a lyophilisation cycle.

Therefore, thermal analysis studies (differential scanning calorimetry, DSC) were performed in order to determine  $T_g$  °C and the presence/absence of metastable state forms for each excipient separately, and for the active substance used as model, plus nine combinations among them.

We have studied two common excipients used in freeze drying formulations: mannitol - in concentrations from 2-7% (w/V) - and polyvinylpyrrolidone K30 (PVP) - in concentrations from 1-5 % (w/V). Mannitol is one of the most common excipients used in oral lyophilisate formulations. It presents a good redispersability and provides crystallinity to the oral lyophilisate -desired for giving a robust aspect. However, it can present polymorphism, which can compromise the stability of the oral lyophilisate. PVP, on the other hand, is an amorphous excipient used in lyophilisation formulas to maintain the structure of the substances during the freezing process, and also helps to increase  $T_g$  °C, which can diminish the lyophilisation cycle time.

## Materials and Methods

### • Materials

Active substance supplied by Reig Jofre Group, mannitol Ph. Eur. and polyvinylpyrrolidone (povidone K30) Ph. Eur. (Fagron Ibérica, SAU, Terrassa). Purified water.

### • Methods

Differential scanning calorimetry (DSC)  
DSC 821<sup>e</sup> Mettler Toledo (Toledo, USA), with software STAR<sup>e</sup> SW 9.30.  
DSC cycle:

- 25 °C to - 80 °C (- 10°C/min)
- - 80 °C 1.0 min
- - 80 °C to 25 °C (10 °C/ min).

## Results

By DSC it was possible to recognize that all mannitol solutions presented metastable state forms, whereas none of the PVP solutions presented (Fig. 1), and so the active substance (with  $T_g$  °C of - 23). Plus, three out of nine formulas studied (with the active substance, A, D

and E) did not presented metastable state forms, all presenting a  $T_g$  °C ranging from -27 to -32°C. Also, it was observed that increased concentration of PVP slightly decreased  $T_g$  °C in the non metastable formula E (Fig. 2).

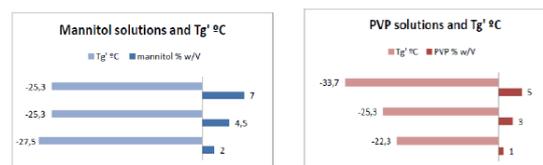


Fig. 1

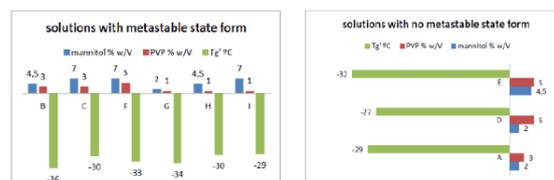


Fig. 2

## Discussion and summary

- PVP inhibited mannitol polymorphism in solutions A, D and E only when added in higher concentration than mannitol, and almost with the same proportion among excipients as in solution E, with 5% PVP (w/V) and 4.5% mannitol (w/V)
- $T_g$  °C was decreased for solutions A, D and E (Fig. 2) in comparison to the results found for each mannitol's concentration studied at 2 and 4.5 w/V % (Fig. 1), showing that the addition of PVP in higher concentration (3 and 5 w/V %) than mannitol did not increase  $T_g$  °C as it would have been expected
- A freeze drying viability test for solutions, A, D and E will be carried out in order to determine if the solutions are able to form a robust oral lyophilisate, with a rapid disintegration time and absence of cracking on the surface

## Acknowledgments

Reig Jofré Group for the active substance.

## Bibliography

- Kasper JC, Friess W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. Eur J Pharm Biopharm 2011, 78, p.248-263.
- Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. Adv Drug Del Rev 2011, 63, p.1053-1073.
- Chandrasekhar R et al. The role of formulation excipients in the development of lyophilized fast-disintegrating tablets. Eur J Pharm Biopharm 2009, 72, p. 119-129.
- Passot S et al. Physical characterisation of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage. Eur J Pharm Biopharm 2005, 60, p. 335-348.

