

ESTUDIO PRELIMINAR DE FOTOESTABILIDAD DEL 1-(FUR-2-IL)-2-NITROPROP-1-ENO

PRELIMINARY PHOTOSTABILITY STUDY OF

1- (FUR-2-YL)-2-NITROPROP-1-ENE

Yaidel A. Quiñones García^{1}, Amalia M. Calvo-Alonso¹, Zenaida Rodríguez Negrín¹,
Isabel M. Caraballoso Noa¹ y Claudia B. Miranda Pérez de Alejo¹*

¹ Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Recibido: Noviembre 9, 2016; Revisado: Febrero 13, 2017; Aceptado: Agosto 8, 2017

RESUMEN(1)

El 1-(fur-2-il)-2-nitroprop-1-eno (UC-244) es un compuesto de marcada acción biológica, sintetizado en el Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, a partir de los desechos de la caña de azúcar. En el presente trabajo se realizó un estudio preliminar de estabilidad como parte del análisis químico-farmacéutico previo a la formulación del producto. Se analizó el comportamiento del producto en estado sólido y en disolución acetónitrilo-agua 80:20, al ser expuesto a la luz solar y protegiéndolo de la misma, para lo cual se tuvieron en cuenta las propiedades organolépticas, temperatura de fusión y cuantificación del compuesto. Para la cuantificación del producto durante el estudio se validó una técnica por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE). La técnica cromatográfica resultó ser específica, lineal en el intervalo de 5 mg/L-40 mg/L, así como precisa y veraz en las condiciones estudiadas. Las muestras sólidas expuestas a la luz se degradaron más del 90 % en 7 días y las que estuvieron protegidas de la misma solo un 25,5 % en 150 días, para las disoluciones expuestas a la luz, la degradación fue de más del 90 % en solo 50 s y las que estuvieron protegidas solo lo hicieron alrededor del 5 % en 50 días. Las muestras degradadas experimentaron cambios significativos en sus propiedades organolépticas y aumento en la temperatura de fusión. Lo anteriormente expuesto permite concluir que cualquier formulación que se desarrolle con el UC-244 debe estar debidamente protegida de la luz.

Copyright © 2018. Este es un artículo de acceso abierto, lo que permite su uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

* Autor para la correspondencia: Yaidel A. Quiñones, Email: yaidelq@uclv.edu.cu

Palabras claves: Cromatografía líquida de alta eficacia; fotoestabilidad; UC-244; validación.

ABSTRACT

1- (fur-2-yl) -2-nitroprop-1-ene (UC-244) is a highly bioactive compound, synthesized in the Center for Bioactive Chemicals at the Central University of Las Villas from sugar cane production wastes. In this work, a preliminary photostability study was carried out as part of the chemical and pharmaceutical analysis prior to product formulation. The effect of sunlight (exposure or protection) on product stability – in terms of organoleptic properties, melting point and UC-244 content - was evaluated both in solid state and in 80:20 acetonitrile-water solutions. In order to determine the UC-244 content in all samples under study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) procedure was validated. This chromatographic technique demonstrated to be specific and linear in the range from 5 mg/L to 40 mg/L, as well as precise and accurate under the conditions studied. Degradation of solid samples exposed to light was higher than 90 % in 7 days, whereas those samples protected from sunlight suffered a degradation of only a 25.5 % after 150 days. Liquid samples exposed to light suffered a degradation higher than 90 % in only 50 s, but in those protected from light, UC-244 content only decreased in about 5 % after 50 days. All degraded samples showed significant changes in their organoleptic properties and an increase in their melting point. Therefore, it can be concluded that any formulation developed with UC-244 should be adequately protected from light.

Keywords: High performance liquid chromatography; photostability; UC-244; validation.

1. INTRODUCCIÓN

El Centro de Bioactivos Químicos, es un centro de investigación dedicado al desarrollo, la producción y la comercialización de productos con marcada actividad biológica, entre los que se encuentra el 1-(fur-2-il)-2-nitroprop-1-eno, también conocido como UC-244, el cual se sintetiza a partir del furfural obtenido de la caña de azúcar. Este compuesto presenta acción antiinflamatoria y acaricida. Es efectivo frente a la sarna psoróptica y sarcóptica, garrapatas ninfas, metaninfas y adultas, así como frente a la fasciola hepática. Se ha demostrado su gran eficacia en la eliminación y el control de plagas, principalmente en almacenes de granos, tales como: sorgo, frijol y harina, (Hernández, 2004).

El desarrollo de un nuevo fármaco pasa por varias fases, dentro de las que se consideran, los estudios químicos-farmacéuticos de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) y sus formulados, que incluye la validación de métodos analíticos, la identificación de impurezas, así como el estudio de su estabilidad en condiciones extremas que pudieran degradar al mismo y probablemente al producto final (WHO, 2009; Regulación 24, 2000). Todos estos aspectos se relacionan con la calidad y la seguridad del futuro medicamento.

El UC-244 ha mostrado, mediante estudios realizados por espectroscopía ultravioleta visible, (Pérez, 2008) que se descompone frente a la luz, tanto en disolución como en estado sólido. Esta característica del compuesto ocasiona la aparición de productos de degradación, hasta el momento desconocidos, que son expresión de su limitada estabilidad. Además poco se ha detallado sobre la cuantificación del mismo frente a la luz solar, incluso nada se ha referido en relación a sus productos de degradación o su comportamiento a medida que aumenta el tiempo de exposición a la luz.

Por tanto, hasta el momento no se cuenta con un estudio de fotoestabilidad, ni con la herramienta analítica para la cuantificación del UC-244 en este. Siendo así, el objetivo de este trabajo es desarrollar un estudio de fotoestabilidad del compuesto y validar una técnica por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) que permita cuantificar al UC-244 cuando sufre fotodegradación debido a la luz solar.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Síntesis, purificación y caracterización del UC-244

Para la síntesis y purificación del UC-244 se utilizaron las mejores condiciones referidas a escala de 2 moles, (Pérez, 2006). La caracterización se realizó mediante la evaluación de las especificaciones de calidad del producto, (Hernández, 2004).

2.2. Validación de la técnica por CLAE

En la validación de la técnica analítica se incluyeron los parámetros: especificidad, linealidad, precisión y veracidad o exactitud, teniendo en cuenta lo expuesto en el Anexo 1 del CECMED (Regulación 37, 2012). Las condiciones cromatográficas fueron: fase móvil: acetonitrilo-agua 80:20; velocidad de flujo: 0,3 mL/min; tipo de columna: Daisogel C-18 de 250 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro; tiempo de análisis: 15 min; detector: UV de λ variable; longitud de onda: 254 nm; volumen de inyección: 20 μ L.

2.3. Estudio preliminar de fotoestabilidad del UC-244

La fuente de luz utilizada fue la luz solar de manera indirecta, por este motivo el alcance del estudio es preliminar, y aunque no cumple estrictamente con lo establecido en las normas internacionales (ICH Q1B, 1998; Huynh-Ba, 2008), sí aporta resultados confiables sobre el comportamiento de este producto frente a la acción de la luz solar. A pesar de que el alcance del estudio es preliminar, el mismo brindará información útil relacionada con el producto en aspectos tales como su posible uso, envases a utilizar, características de almacenamiento y comercialización futura (Vipul y Devesh, 2012; Welankiwar et al., 2013).

2.3.1. Muestras sólidas

Se utilizaron como recipientes 8 placas Petri transparentes de 15 cm de diámetro y 2,5 cm de altura. Se colocó alrededor de 1 g de UC-244 extendido en toda la superficie de la placa. 4 placas se colocaron en la oscuridad (protegidas de la luz) y 4 expuestas a la luz solar de manera indirecta, es decir, en el interior de una habitación junto a una ventana.

Las muestras protegidas de la luz se analizaron en los días 0, 40, 110 y 150 y las muestras expuestas a la luz solar se analizaron los días 0, 1, 3, 4 y 7.

Se evaluaron propiedades físicas y químicas que influyen en la calidad del producto, tales como: propiedades organolépticas (color y aspecto), temperatura de fusión y cuantificación de la pureza. Como criterios de aceptación para cada una de estas propiedades se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: se presenta en forma de sólido cristalino seco, de color amarillo brillante; temperatura de fusión: entre 47 °C y 49 °C; pureza: entre 98 % y 102 %. Si el UC-244 incumple con alguno de estos criterios se considera que ha sufrido una degradación.

2.3.2. Disoluciones

Se prepararon dos disoluciones de UC-244 a 30 mg/L en acetonitrilo-agua 80:20, una se mantuvo en frasco de color ámbar protegida de la luz solar, y la otra expuesta a la luz solar de manera indirecta. La disolución protegida de la luz solar se analizó a los días 0, 30, 40 y 50 de preparada, y la disolución expuesta a la luz se analizó a tiempo 0, 15, 25, 35 y 50 s. Se observó el cambio de color y cuantificación de la pureza. Los criterios de aceptación se tuvieron en cuenta según el epígrafe anterior (2.3.1).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntesis, purificación y caracterización del producto obtenido

En la Figura 1 se muestra el UC-244 obtenido como resultado de la síntesis y la purificación. El UC-244 purificado, cumplió con las especificaciones de calidad requeridas: sólido cristalino y seco de color amarillo, temperatura de fusión de 47 °C y pureza de 99,23 %. Los resultados anteriores demuestran que el método de purificación empleado permite obtener un producto con la calidad necesaria para realizar los estudios de fotoestabilidad deseados.

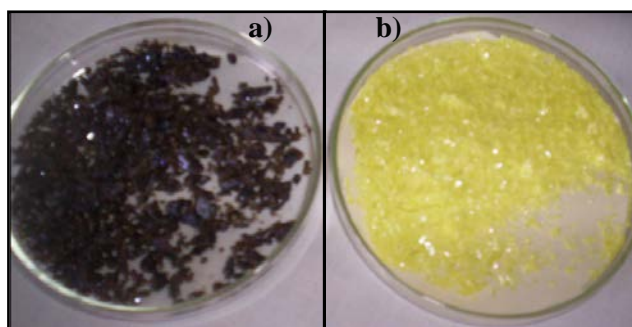


Figura 1. UC-244 a) sin purificar y b) purificado

3.2. Validación de la técnica empleada

La validación de la técnica es de vital importancia pues permite obtener resultados confiables del desempeño de la misma, lo que indica que la técnica aplicada cumple con todos los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. La cuantificación del producto se realizará mediante Cromatografía líquida de alta eficacia debido a la versatilidad de la técnica y amplio campo de aplicación en separar y detectar componentes en las mezclas.

3.2.1. Parámetros empleados para la validación de la técnica

3.2.1.1. Especificidad

La especificidad es la habilidad o capacidad de un método analítico que permite distinguir al analito que será determinado de las demás sustancias presentes en la muestra.

En la Figura 2 se muestran los cromatogramas obtenidos de las disoluciones del UC-244 en la fase móvil (FM) acetonitrilo-agua 80:20, a diferentes tiempos de exposición indirecta a la luz solar (PD-1, PD-2 y PD-3 son productos de degradación):

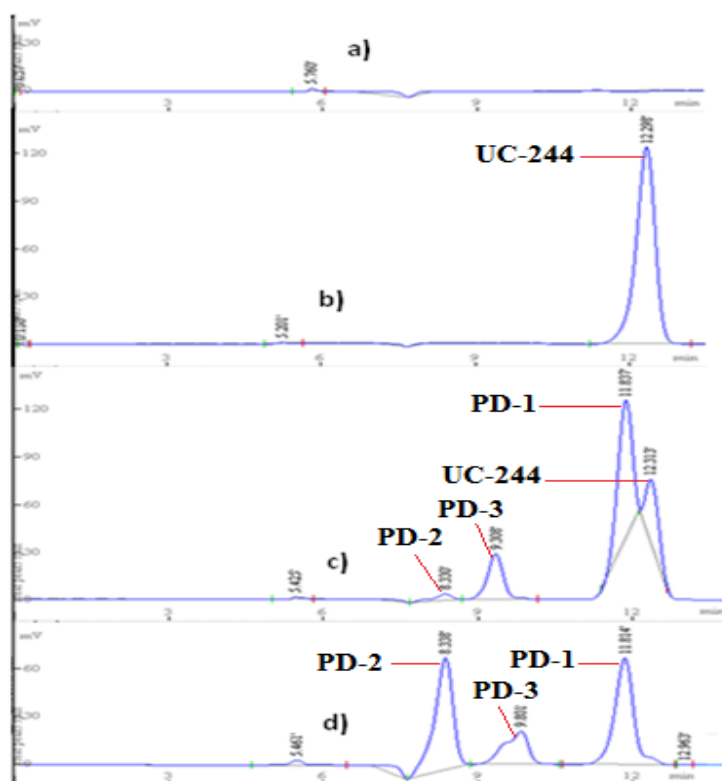


Figura 2. Cromatogramas de CLAE para el UC-244 disuelto en FM, tras exposición a la luz solar indirecta: a) blanco o FM; b) tiempo 0; c) después de 1 min; d) después de 24 h

El UC-244 se obtiene con un tiempo de retención de 12 min, el cual es diferente al de los otros picos que aparecen en los cromatogramas c) y d); aunque la resolución existente entre los picos del compuesto en estudio y el PD-1 en el cromatograma c) perteneciente a la figura 2 es parcial, esta es suficiente para realizar la cuantificación del UC-244 en presencia de sus productos de degradación.

Por tanto, en las condiciones propuestas el método de análisis empleado es específico en las condiciones estudiadas.

3.2.1.2. Linealidad

Se realizó una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 5 mg/L a 40 mg/L. La curva obtenida se muestra en la Figura 3, los resultados de la linealidad demuestran que existe una correlación lineal positiva entre la concentración y el área determinada, superior al 99,9 % (R^2 igual a 0,9996 y R igual a 0,9998).

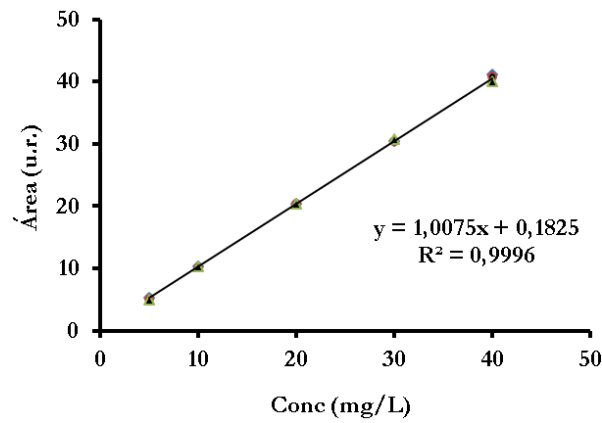


Figura 3. Linealidad de la técnica empleada por CLAE

3.2.2.3. Precisión

Se tuvo en cuenta la repetibilidad y la precisión intermedia, a tres niveles de concentración (10 mg/L, 20 mg/L y 30 mg/L) en dos días y se determinó el coeficiente de variación (CV%) para ambos parámetros. En ambos casos se obtienen coeficientes menores que el 2 % para cada concentración, cumpliéndose que:

$$CV_{\text{Precisión intermedia}} > CV_{\text{Repetibilidad}}$$

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos al comparar las medias de las concentraciones de ambos días entre sí (precisión intermedia), utilizando pruebas de significación (sig.) adecuadas a través de software como el STATISTICA 8.0 y el STATGRAPHICS Centurion XV. En los resultados obtenidos de las pruebas anteriores, se observa que no existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de ambos días. Por tanto, el método es preciso en las condiciones estudiadas.

Tabla 1. Precisión intermedia de la técnica empleada por CLAE

α	Día 1 vs Día 2	Concentración (mg/L)	N	Muestras relacionadas		
				Correlaciones		Prueba
				Correlación	Sig.	Sig. (bilateral)
0,05	Par 1	10	4	0,784	0,216	0,700
	Par 2	20	5	0,730	0,161	0,585
	Par 3	30	4	0,518	0,482	0,346

3.2.2.4. Veracidad

El análisis de la veracidad o exactitud se realizó, a tres niveles de concentración (10 mg/L, 20 mg/L y 30 mg/L). Se determinó la concentración media (Conc. _{media}) utilizando la ecuación de la curva de linealidad, el porcentaje de recobro medio (% recobro _{medio}) y la “t de Student” experimental (t_{exp}) para cada uno de los tres puntos evaluados, para luego compararlos con el valor tabulado (t_{tab}) y cumplir la siguiente condición: si $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ entonces estos valores no son estadísticamente diferentes y el método tiene la exactitud requerida (Tabla 2).

Tabla 2. Veracidad de la técnica empleada por CLAE

<i>Concentración teórica (mg/L)</i>	<i>Concentración experimental media (mg/L)</i>	<i>S_{Conc. media}</i>	<i>% recobro medio</i>	<i>t_{exp.}</i>	<i>t_{tab.}</i>
10,04	10,0152	0,0777	99,80	0,114	2,571
20,07	20,1668	0,1766	100,48	1,225	
30,11	30,2692	0,1799	100,55	2,041	

El porcentaje de recobro medio para cada concentración se encuentra en el intervalo de 98 % -102 % y en todos los casos la t_{exp} es menor que la t_{tab} , por lo que no existen diferencias significativas en los resultados hallados. Por tanto, la técnica es veraz en las condiciones estudiadas.

3.3 Estudio fotodegradativo preliminar del UC-244

3.3.1. Muestras sólidas

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis de las propiedades organolépticas y la temperatura de fusión de las muestras sólidas de UC-244.

Tabla 3. Muestras sólidas. Propiedades organolépticas y temperatura de fusión

<i>Muestras</i>	<i>Tiempo (días)</i>	<i>Propiedades organolépticas</i>	<i>Temperatura de fusión</i>
Expuestas a la luz	0	Sólido amarillo con brillo	Entre 47 °C y 49 °C
	1	Sólido amarillo con brillo pasando a carmelita oscuro, opaco (resina oscura)	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la temperatura de fusión a más de 150 °C • Al aumentar el tiempo de exposición aumentan los restos sin fundir
	3		
	4		
	7		
Protegidas de la luz	0	Sólido amarillo con brillo pasando a carmelita pálido	
	40		
	110		
	150		

La Tabla 4 muestra los datos del porcentaje relacionado con el contenido de UC-244 en las muestras sólidas expuestas y protegidas de la luz solar, por CLAE.

Los resultados obtenidos en las muestras sólidas expuestas a la luz solar durante 7 días, muestran una degradación del 93,37 %, quedando solamente del contenido de UC-244 en las mismas un 6,63 % en este periodo de tiempo y en las muestras protegidas de la luz, el contenido de UC-244 fue de un 74,39 % en un período de 150 días para una degradación de un 25,61 %. Esto demuestra el efecto marcado que tiene la luz en la degradación del compuesto y de su poca estabilidad, incluso protegido de la luz aunque en menor escala.

Tabla 4. Contenido de UC-244 en las muestras sólidas, por CLAE

<i>Muestras</i>	<i>Tiempo de muestreo (días)</i>	<i>Contenido de UC-244 (%)</i>
Expuestas a la luz	0	100,00
	1	75,12
	3	40,17
	4	22,46
	7	6,63
Protegidas de la luz	0	100,00
	40	94,91
	110	81,75
	150	74,39

Lo expuesto anteriormente es de mucha importancia porque permite, además, seleccionar el envase adecuado para el uso, almacenamiento y posible comercialización del producto, por ejemplo: frascos de vidrio de color ámbar, herméticos, etc.

3.3.2. Disoluciones

Los cromatogramas resultantes de las disoluciones expuestas a la luz solar muestran una degradación progresiva con el tiempo de exposición, en 50 s el contenido de UC-244 disminuyó hasta un 3,75 %, lo que equivale un 96,25 % de degradación (Figura 4). No sucedió así con las protegidas de la luz solar, en 50 días el contenido de UC-244 disminuyó a un 94,84 %, en este caso la pérdida por degradación fue de un 5,16 % (Figura 5). Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 5, estos demuestran la importancia de analizar inmediatamente y siempre protegidas de la luz solar, las disoluciones de trabajo del compuesto.

Tabla 5. Disoluciones. Porcentajes de pureza y de degradación del UC-244 por CLAE.

<i>Muestras</i>	<i>Tiempo de muestreo</i>	<i>Contenido de UC-244 (%)</i>
Expuestas a la luz	0 s	100
	15 s	35,45
	25 s	20,38
	35 s	10,42
	50 s	3,75
Protegidas de la luz	0 días	100
	30 días	97,09
	40 días	95,57
	50 días	94,84

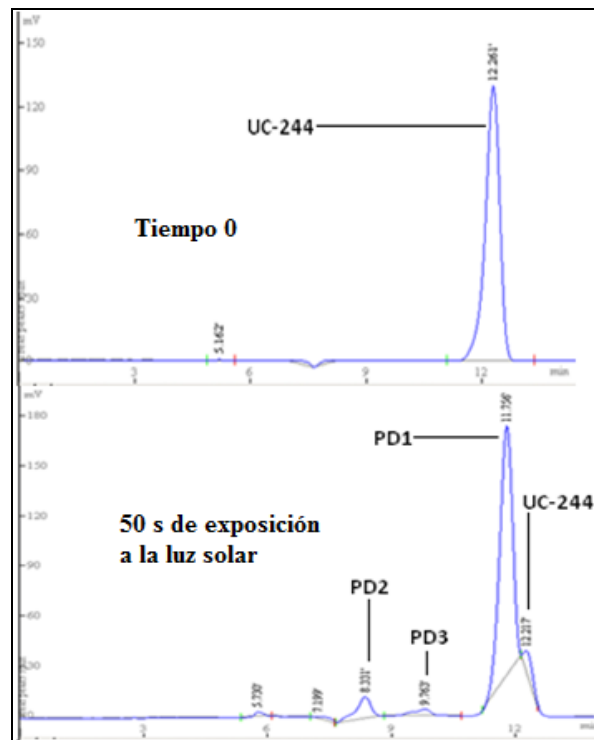


Figura 4. Cromatogramas de las disoluciones de UC-244 expuestas a la luz solar

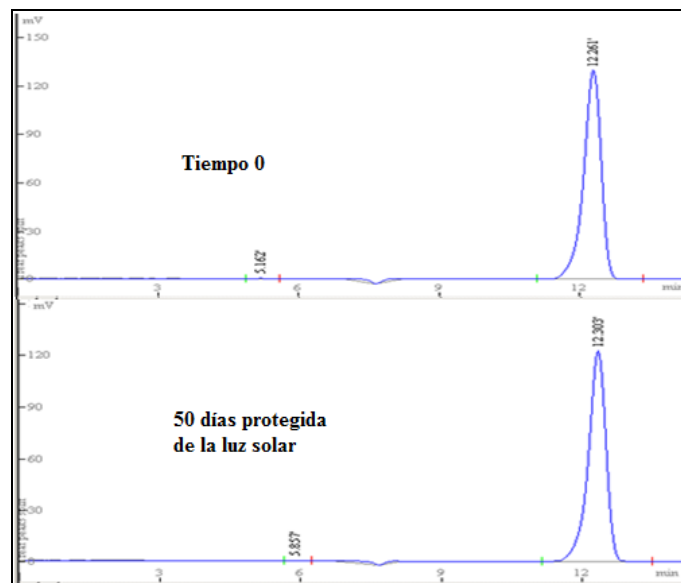


Figura 5. Cromatogramas de las disoluciones de UC-244 protegidas de la luz solar

4. CONCLUSIONES

1. El método por CLAE es específico y lineal en el intervalo de 5mg/L a 40 mg/L, además preciso y veraz en las condiciones estudiadas.
2. El estudio fotodegradativo preliminar del UC-244 tanto en estado sólido como en disolución reveló que el mismo experimenta una rápida degradación si es expuesto a la luz solar, por tanto, el producto UC-244 y sus formulaciones deben

protegerse de la acción de la misma y sus disoluciones de trabajo analizadas inmediatamente.

REFERENCIAS

- Hernández, M., Desarrollo de una técnica para la cuantificación y el estudio de las mejores condiciones de obtención del 1- (fur-2-il)-2-nitropop-1-eno, Tesis presentada en opción al grado de Licenciado en Química en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 2004.
- Huynh-Ba, K., Handbook of stability testing in pharmaceutical development., Regulations, Methodologies and Best Practices, Editorial Springer, New York, 2009, pp. 285-302.
- ICH Q1B., Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products., Step 5. European Medicines Agency, CPMP/ICH/279/95., http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002647.pdf [consultado 1 de marzo 2012], 1998, pp. 5-9.
- Pérez, D., Estudio de las mejores condiciones de síntesis y purificación del UC-244, Tesis presentada en opción al grado de Licenciado en Química en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 2006.
- Pérez, M., Desarrollo y validación de técnicas analíticas por HPLC y SQV, para determinar el contenido de UC-244, Tesis presentada en opción al grado de Licenciado en Química en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 2008.
- Regulación 37, Anexo No. 1, Validación de métodos analíticos., CECMED, MINSAP, La Habana, Cuba, 2012, pp. 12-21.
- Regulación 24, Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos., CECMED, MINSAP, La Habana, Cuba, 2000, pp. 1-7.
- Vipul, A., and Devesh, S., Stability testing of active pharmaceutical ingredient [API]., Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation, Vol. 1, No. 2, Mar.-Abr., 2012, pp. 18-23.
- Welankiwar, A., Saudaghar, S., Kumar, J., Barabde, A., Photostability testing of pharmaceutical products., International Research Journal of Pharmacy, Vol. 4, No. 9, Sept. 2013, pp. 11-15.
- WHO Technical Report Series., Organization WH., Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products., 2009, Vol. 953, pp. 87-123.