

68

Fecha de presentación: Septiembre, 2021

Fecha de aceptación: Noviembre, 2021

Fecha de publicación: Diciembre, 2021

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE SUSPENSIONES DE ALBENDAZOL PARA USO PEDIÁTRICO

PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AL- BENDAZOLE SUSPENSIONS FOR PEDIATRIC USE

Maylin Yessenia Alvarado¹

E-mail: maylin.alvarado@unah.edu.hn

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0643-1245>

Henry Daniel Ponce¹

E-mail: henry.ponce@unah.edu.hn

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8949-7679>

María Lourdes Enríquez¹

E-mail: lourdes@unah.edu.hn

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6494-2449>

Lilian Sosa¹

E-mail: lilian.sosa@unah.edu.hn

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-9482>

¹ Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Tegucigalpa. Honduras.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Alvarado, M. Y., Ponce, H. D., & Sosa, L. (2021). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de suspensiones de albendazol para uso pediátrico. *Revista Universidad y Sociedad*, 13(S3), 515-523.

RESUMEN

Es necesario el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de las enfermedades helmínticas en la población pediátrica. Objetivo. Se elaboraron dos suspensiones de albendazol (ABZ-S) a una concentración final de 400 mg/10 mL, y caracterizadas desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico. Metodología. Para ambas suspensiones se llevó a cabo la medición de pH, densidad, volumen de sedimentación, viscosidad, tamaño de partícula, polidispersión y potencial Z. Además, se realizó la validación de una metodología analítica para cuantificar el fármaco y finalmente su evaluación microbiológica. Resultados. Los valores de pH de las ABZ-S oscilaron entre 4,83-5,34. Las densidades resultantes de ABZ-S1 y ABZ-S2 fueron de $1,03 \pm 0,01$ y $1,04 \pm 0,01$ mg/mL, respectivamente. El volumen de sedimentación encontrado fue entre 0,97 y 1,0. Ambas suspensiones presentaron un flujo pseudoplástico. Los tamaños de partícula encontrados fueron menores a los 10 μm y el valor de potencial Z para ABZ-S1 fue de $-41,40 \pm 1,37$ y para ABZ-S2 fue de $-36,00 \pm 3,03$ MV. El contenido de fármaco presente en ABZ-S1 fue de 93,30% y para ABZ-S2 de 88,41%. Los valores encontrados de bacterias resultaron inferiores a 10 UFC/mL.

Palabras clave: Albendazol, enfermedades helmínticas, HPLC, tamaño de partícula, viscosidad, microbiología.

ABSTRACT

The development of new pharmaceutical formulations for the treatment of helminthic diseases in the pediatric population is necessary. Objective. Two suspensions of albendazole (ABZ-S) were made at a final concentration of 400 mg / 10 mL, and characterized from the physicochemical and microbiological point of view. Methodology. For both suspensions, the measurement of pH, density, sedimentation volume, viscosity, particle size, polydispersity and Z potential was carried out. In addition, the validation of an analytical method was carried out to quantify the drug and finally its microbiological evaluation. Results. The pH values of the ABZ-S ranged from 4.83-5.34. The resulting densities of ABZ-S1 and ABZ-S2 were 1.03 ± 0.01 and 1.04 ± 0.01 mg / mL, respectively. The sedimentation volume found was between 0.97 and 1.0. Both suspensions presented a pseudoplastic flow. The particle sizes found were less than 10 μm and the Z potential value for ABZ-S1 was -41.40 ± 1.37 and for ABZ-S2 it was -36.00 ± 3.03 MV. The content of drug present in ABZ-S1 was 93.30% and for ABZ-S2 was 88.41%. The values found for bacteria were lower than 10 CFU / mL. Conclusions. ABZ-S1 was the formulation that presented the best results.

Keywords: Albendazole, helminthic disease, HPLC, particle size, viscosity, microbiology.

INTRODUCCIÓN

Los Helminthos Transmitidos por el Suelo (HTS, por sus siglas en inglés) también denominada Geohelmintiasis es un problema de salud pública especialmente en los países en vías de desarrollo, siendo los niños los más afectados. Si bien la mortalidad por HTS no es muy alta, sí son importantes las consecuencias de la enfermedad, que provoca, en el aspecto físico, problemas en el desarrollo, retraso en el desempeño cognitivo, pérdida de memoria, ausentismo y deserción escolar, fatiga crónica, dolor abdominal intermitente y anemia; y a nivel social afecta la autoestima, puede generar exclusión social y es causante de años de vida perdidos por discapacidad (OPS, 2018).

La principal estrategia para la eliminación de estos HTS es la quimioterapia preventiva que emplea antihelmínticos, especialmente los derivados del anillo benzimidazol, como el albendazol (ABZ) o mebendazol (MBDZ) (Albonico et al., 2015).

El ABZ (5-propylthio-1H-benzimidazole-2-yl) es un éster metílico del ácido carbámico que se aprobó por primera vez como antihelmíntico para su uso en humanos en 1982. Este fármaco daña de forma selectiva los microtúbulos citoplasmáticos de las células intestinales del parásito, pero no del huésped, ocasionando la ruptura de dichas células y la pérdida de funcionalidad secretora y absorbente (Verrest y Dorlo, 2017). Su espectro de acción cubre ascaridiasis, enterobiasis, trichuriasis, anquilostomiasis y uncinuriasis. Se conoce que, después de administrar 400 mg de ABZ, este fármaco no se detecta en el plasma porque se metaboliza con rapidez en el intestino e hígado, formando un sulfóxido; dicho metabolito posee potente actividad antihelmíntica, lo que le confiere un elevado potencial terapéutico (Townsend y Wise, 1990).

En Honduras se han realizado varios estudios clínicos y epidemiológicos sobre parásitos intestinales, pero muy pocos trabajos son publicados y, por tanto, se dificulta hacer un análisis preciso de la temática. Para 2015 se reportó que en el país había 650.841 niños en edad preescolar y 1.748.936 niños en edad escolar que deberían recibir tratamiento por el hecho de vivir en zonas endémicas. La Secretaría de Salud hondureña informa que en ese año se realizaron dos rondas de desparasitación, alcanzando coberturas de 68,3% y 71,39% en niños en edad escolar y preescolar, respectivamente (Matamoros et al., 2017). En estas campañas de desparasitación se distribuyeron y administraron medicamentos antiparasitarios como el albendazol, que tiene una relación costo-efectividad positiva (Kaminsky, 2015).

Cabe mencionar existen estudios que han demostrado que debido al uso indiscriminado de metronidazol en el

tratamiento de diarreas ambulatorias hay una resistencia de 10% a 15% contra el tratamiento de la giardiasis. Esto ha dado pie a la búsqueda de fármacos alternativos. Por otra parte, el Programa Mundial de Alimentos (PMA) ha señalado que, en países como Haití, Honduras y Perú las iniciativas de alimentación en escuelas funcionan mejor cuando se combinan con la desparasitación dos veces al año, ya que los parásitos presentes en los intestinos de los niños roban una gran parte de los nutrientes que proporcionan los alimentos (Samra-Vázquez et al., 2000).

Lo expresado confirma la necesidad de contar con este tipo de medicamentos, especialmente incorporados dentro de una forma farmacéutica de fácil administración. En el uso oral, en niños pequeños y neonatos, la tableta de 400 mg no facilita la dosificación. Las formas farmacéuticas líquidas, en cambio, ofrecen ventajas como la administración de dosis precisas, reducción del riesgo de errores de medicación, mejor adherencia a la medicación y optimización de los resultados terapéuticos en los niños (Ernest et al., 2007).

Considerando todo lo expuesto, en esta investigación nos planteamos los siguientes objetivos: formular dos suspensiones de ABZ a una concentración de 400 mg/10 mL, así como realizar su caracterización fisicoquímica mediante: i) medición de pH, ii) densidad, iii) características organolépticas, iv) reología y viscosidad, v) determinación del tamaño de partícula vi), polidispersión, vii) estabilidad acelerada, viii) cuantificación del fármaco en las formulaciones y, finalmente, ix) la caracterización microbiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron materias primas y materiales de calidad farmacéutica: ABZ (Corporación Quirsa, Santa Tecla, El Salvador), Carboximetil celulosa sódica o CMC-Na (Sinochem Jiangsu CO., LT, Distribuidora del Caribe, San Pedro Sula, Honduras), veegum K (VanderbiltMinerals, LLC, Corporación Quirsa, Santa Tecla, El Salvador), glicerina (OLFAR, Distribuidora del Caribe, San Pedro Sula, Honduras); benzoato de sodio (Sinochem Jiangsu CO., LT, Corporación Quirsa, Santa Tecla, El Salvador); sacarina sódica (Guangxi Golden-Stride Import & Export Co., Ltd., Distribuidora del Caribe, San Pedro Sula, Honduras), saborizante (Acofarma®, Barcelona, España), ácido cítrico (TTCA CO., LTD., Distribuidora del Caribe, Honduras), citrato de sodio (RZBC(JUXIAN) CO., LTD., Distribuidora del Caribe, Honduras) y agua Milli-Q® Plus System (Millipore Co., Burlington, MA, USA). Todos los reactivos y químicos utilizados fueron de calidad analítica y cromatográfica.

Se elaboraron 2 formulaciones de ABZ-S (ABZ-S1, ABZ-S2) para un total de 1.000 mL de cada una de ellas. Para ello se procedió a tamizar el fármaco por un tamiz número 200, de una abertura de 75 μ m (US standard Sive, USA). Cada una de las materias primas se pesó en una balanza analítica (Ohaus, Explorer Pro, México, DF, México). La CMC-Na se preparó con un promedio de 150 a 200 mL de agua destilada. El agua se adicionó a un beaker, el cual se colocó en un plato caliente (Corning, Scholar 170, USA) hasta que el líquido alcanzó una temperatura entre 80 \pm 5 °C. Una vez alcanzada la temperatura se adicionó la CMC-Na y se agitó con ayuda de una varilla de agitación, hasta lograr la completa dispersión. Seguidamente se dispersó el Veegum y el benzoato de sodio en el buffer. Posteriormente se adicionó al fármaco previamente humectado, con agitación constante, hasta la completa homogenización. El buffer pH 5 utilizado se elaboró mezclando 25mL de ácido cítrico 0.1M y 75mL de citrato de sodio 0.1M.

Durante el desarrollo de la investigación se realizaron los siguientes ensayos fisicoquímicos: medición de pH, densidad relativa, volumen de sedimentación, viscosidad/comportamiento reológico, tamaño de partícula, potencial Z y estabilidad acelerada.

c.1. Determinación de las características organolépticas, pH y densidad

- Se evaluó la apariencia de las suspensiones obtenidas, observando durante 51 días consecutivos el color, olor y sedimento. Los valores de pH se determinaron tomando 20 mL de cada una de las suspensiones, a intervalos de 1, 7, 14, 20 y 51 días, haciendo uso de un phmetro multiparámetros HANNA, HI 9829 (Bogotá, Colombia).
- Se midió la densidad de las formulaciones con la ayuda de un picnómetro de 20mL de capacidad, y para establecer el volumen de sedimentación se colocaron 100 mL de cada formulación en probetas de vidrio de igual capacidad. Se determinó el volumen que ocupaba el sedimento (mL) a los intervalos de tiempo de 1, 7, 14, 20 y 51 días. A partir de los valores obtenidos se procedió a realizar los cálculos del volumen de sedimentación, siguiendo la expresión matemática:

$$F=Vu/Vo \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

F= volumen de sedimentación, *Vu*= volumen en equilibrio del sedimento, *Vo*= volumen total de la suspensión.

Las mediciones reológicas fueron realizadas mediante un reómetro rotacional Thermo Scientific Haake Rheostress 1

(Thermo Fischer Scientific Haake Rheostress, Kalsruhe, Alemania) equipado con un sistema placa-placa. Para ello, cada muestra se sometió a un programa de cizalla que incluía un tramo de velocidad ascendente desde 0 hasta 100 s⁻¹ durante 3 minutos, seguido de un tramo a velocidad constante de 100 s⁻¹ durante 1 minuto, para finalizar con un tramo descendente de 100 s⁻¹ hasta 0 s⁻¹ durante 3 minutos, a una temperatura de 25°C. El reómetro utilizado en modo rotacional permitió la obtención de las curvas de viscosidad y de flujo (n=2).

Las mediciones del tamaño de partícula fueron elaboradas mediante el Master sizer Malvern (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), realizando una dilución de 1/10mL de las suspensiones de ABZ-S1 y ABZ-S2 en agua desionizada, dejándolas reposar 24 horas para evitar la formación de burbujas, a 25°C (n=3).

Se utilizó el método de dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) mediante un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Se realizó una dilución de 1/10mL de ABZ-S1 y ABZ-S2 en agua desionizada a una temperatura de 25°C (n=3).

Para predecir la estabilidad de la suspensión tras un período de tiempo se procedió al análisis de la muestra mediante la técnica de DLS, utilizando un Turbiscan® (Lab, Formulacion Co, L'Union, Francia). Se colocaron 20mL de la muestra, sin diluir, en un vial cilíndrico de vidrio (35mL) que fue completamente escaneado por un cabezal de lectura consistente en una fuente de luz de infrarrojo cercano (λ = 880nm). El cabezal de lectura registró los datos de transmisión cada hora durante 24h a 25°C (Provenza, 2014).

El método analítico desarrollado fue el descrito en la USP 35 (2012), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna eclipse (XDB-C18, Agilent, 5 μ m, 4,6 x 150mm, USA), como diluyente metanol: ácido clorhídrico 98% (9:1) (J.T. Baker, Labhospy, S de R.L. San Pedro Sula, Honduras); la fase móvil fue constituida por 11g fosfato monobásico de sodio disuelto en 800mL de agua desgasificada y 1.200mL de metanol (J.T. Baker, Labhospy, S. de R.L., San Pedro Sula, Honduras), con una velocidad de flujo de 1,5mL/min y un volumen de inyección de 20 μ L. Se empleó un detector Ultravioleta, con arreglo de diodos, a una longitud de onda de 308 nm y con un tiempo de análisis de 8-10 minutos en el HPLC, Shimadzu, Prominence.

La preparación del estándar y la muestra se realizó según el método descrito en la USP 35 (2012). La muestra se trabajó con volúmenes más pequeños que los indicados, conservando las concentraciones establecidas.

Se verificó la metodología analítica para la cuantificación de albendazol mediante el método HPLC, a través de los siguientes parámetros: repetibilidad, reproducibilidad, linealidad y especificidad, tomando en cuenta los criterios establecidos en cada caso en la literatura y en consideración al propósito con que fue desarrollado, según el método de control de pruebas cuantitativas del contenido de IFA, establecido por la Harmonised Tripartite Guideline ICH (ICH, 2005; RTCA, 2010).

Linealidad: se realizó por triplicado una curva de calibración. Se disolvieron 25mg del estándar de referencia de albendazol en metanol acidificado, llevando a volumen en un matraz volumétrico de 25mL para obtener una solución madre que contenía una concentración conocida de aproximadamente 1mg/mL. Luego se tomó una alícuota de 4mL y se llevó a un matraz volumétrico de 10mL con fase móvil y se mezcló. Se tomaron 4 tubos de ensayo graduados con 2mL de fase móvil cada uno. Después se tomaron dos alícuotas de 2mL del matraz de 10mL; una de las alícuotas se filtró y se llevó al cromatógrafo. La otra alícuota se transfirió a un tubo de ensayo graduado. Seguidamente se tomaron 2mL de esta última y se pasaron a otro tubo de ensayo. Este procedimiento se repitió 3 veces hasta obtener los puntos o concentraciones diferentes de la curva de calibración (dilución doble seriada): 400µg/mL, 200µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12,5µg/mL. El contenido de cada tubo de ensayo se filtró y se inyectó por quintuplicado en el cromatógrafo. La técnica de dilución doble seriada se aplicó tomando en cuenta otros trabajos de validación en los cuales se hace uso de ella (Alvarado et al., 2015; Provenza et al., 2014). Con los datos de las tres réplicas se llevó a cabo el análisis de regresión lineal (concentración versus respuesta analítica (áreas)). Se calculó la pendiente (m), intercepto (b), el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y la desviación estándar, con una probabilidad del 95% ($\alpha = 0,05$).

Precisión: el análisis se realizó mediante la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia. Para la repetibilidad la curva de calibrado tenía 5 puntos de concentración a partir del estándar de referencia, 400µg/mL, 200µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12,5µg/mL. Con los datos obtenidos se cuantificó el porcentaje de analito presente en la suspensión de albendazol de 400mg/100mL, tomando de la suspensión 6 muestras, cada una de 625µL, que se transfirieron a un matraz volumétrico de 25mL. La muestra de cada matraz se diluyó con metanol acidificado y se mezcló colocándola en un baño ultrasónico durante una hora, a una temperatura entre 40 y 50 °C. Luego se transfirió 1mL de esta solución a un segundo matraz volumétrico de 10 mL y se diluyó con fase móvil a

volumen, se mezcló y filtró previo su inyección al HPLC. Cada muestra fue inyectada por quintuplicado. Luego se realizaron los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de analito presente en la suspensión. Para evaluar la reproducibilidad se trabajó el mismo procedimiento que para el parámetro de repetibilidad, repitiéndolo en dos días consecutivos, es decir que en cada día se preparó una curva de calibración con 5 puntos de concentración, así como el análisis de seis muestras tomadas de la suspensión de albendazol de 400mg/100mL.

Exactitud: se analizaron 9 muestras utilizando 3 niveles de concentración que cubren el rango de trabajo: 12.5µg/mL, 50µg/mL y 400µg/mL, empleando el método de adición de estándar al placebo (fortificación). Para la evaluación de la exactitud se preparó una curva de calibración con 5 puntos de concentración a partir del estándar de referencia. También se preparó un estándar para fortificar las muestras placebo en los 3 niveles de concentración. Para el nivel 1 y 2 el estándar se preparó pesando 25mg del mismo y se llevó a volumen en un matraz volumétrico de 25mL con diluyente (Metanol: HCl). Para el nivel 3 se pesaron 125mg del mismo estándar de referencia y se llevaron a volumen en un matraz volumétrico de 25mL con fase móvil. Se elaboró un placebo que fue fortificado para cada nivel de concentración seleccionado.

Para el nivel 1 y 2 se midieron 625µL del placebo, los cuales se colocaron en un matraz volumétrico de 25mL, luego estos se fortificaron con 3mL del estándar (3mg/mL), aforando con diluyente (Metanol: HCl). Se tomaron alícuotas de 1 y 4 mL, se transfirieron a matraces de 10mL y se diluyeron con fase móvil a volumen, luego se mezclaron y filtraron previo su inyección al cromatógrafo. Para el nivel 3 se midieron 625µL del placebo, que se colocaron en un matraz volumétrico de 25mL, después se fortificaron con 5mL del estándar (25mg/mL), completando el volumen con diluyente (Metanol: HCl). Se tomó una alícuota de 4mL, se transfirió a un matraz de 10mL y se diluyó con fase móvil a volumen, se mezcló y filtró previo a su inyección al cromatógrafo. Para cada nivel el procedimiento se repitió 3 veces. Se determinaron los coeficientes de variación y porcentaje de recuperación. También se realizó la prueba de Cochran, con vistas a comprobar si la variación de la concentración produce diferencias significativas en los resultados y las pruebas de t de Student para el intervalo de confianza.

Especificidad: para el estudio de especificidad se analizaron la sustancia de referencia de albendazol, el placebo sin albendazol y la muestra de producto terminado, todos tratados de la misma manera, tal como lo indica la USP, haciendo uso de los espectros de absorción de

estándares y muestras obtenidas con el detector de arreglo de diodos DAD.

Se siguieron las indicaciones reflejadas en la USP 35 del 2012 para el ensayo de recuento microbiano de productos no estériles. Para el desarrollo del método se utilizaron 90mL de agua de dilución pH 7: agua peptonada y cloruro de sodio, a la cual se le adicionaron 10mL de las muestras (agua destilada, ácido cítrico, citrato de sodio y buffer ácido cítrico/citrato de sodio) filtrados a través de un filtro de membrana con base de nitrocelulosa de 0,22 micras de diámetro, obteniendo una concentración de 10^{-1} al agitar durante 5 minutos. Luego se tomó una alícuota de 1mL y se transfirió a un tubo de ensayo que contiene agua de dilución, para así obtener una dilución de 10^{-2} . De esta dilución se tomó una alícuota de 1mL y se transfirió a otro tubo de ensayo con agua de dilución para alcanzar una concentración de 10^{-3} . Luego se procedió a sembrar por triplicado 100 μ L de las 3 diluciones en placas con los siguientes medios de cultivo: PDA (Agar papa dextrosa para hongos y levaduras), SMA (Agar estándar para microorganismos aerobios) y VRBA (Agar biliado-rojo neutro-cristal violeta para gram negativos). Todos los medios de cultivo fueron marca Oxoid™ (ThermoScientific™, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se incubaron las placas de SMA y VRBA por 24 horas a 37 °C. Las placas de PDA se guardaron en un recipiente cerrado a temperatura ambiente por una semana (USP, 2012)

Se llevó a cabo el mismo procedimiento estipulado en el inciso e.1.

Para el análisis de los datos obtenidos en los experimentos con el ABZ-S se emplearon hojas de cálculo de Microsoft Excel 2010, además del software EZ Start versión 7.4 y el programa estadístico Statgraphics versión 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se elaboraron dos formulaciones de ABZ en forma de suspensión para administración oral, específicamente de uso pediátrico. En la tabla 1 podremos observar la composición final de las mismas.

Tabla 1. Composición final de las suspensiones de ABZ.

Componente	ABZ-S1(%)	ABZ-S2 (%)
Albendazol	4.00	4.00
CMC -Na	0.20	0.20
Veegum – K	0.50	1.00
Glicerina	5.30	20.00

Benzoato de sodio	0.20	0.20
Sacarina sódica	0.50	0.50
Colorante	0.50	0.50
Saborizante	0.50	0.50
Agua csp	100	100

El color blanco de las formulaciones, se mantuvo sin alteración durante 51 días. El pH obtenido en las suspensiones se detalla en la tabla 2, manteniéndose los valores en el rango adecuado según criterio de la USP 35 (4,5 y 5,5), el cual no se alteró con el paso del tiempo, indicando estabilidad para este parámetro. Un resultado similar se pudo observar en un estudio de una formulación y evaluación de ABZ formulada en una suspensión (Kumar y Sharma, 2015). En relación a la densidad relativa, la diferencia en las densidades fue muy poca, ABZ-S1= 1,03g/mL \pm 0,01 y ABZ-S2= 1,05mg/mL \pm 0,01.

El sedimento tuvo la característica de ser voluminoso. La variación de este parámetro entre las formulaciones fue de muy escasa a nula, y los valores finales del factor de sedimentación resultaron iguales o cercanos a 1 (tabla 2). Este comportamiento podría estar relacionado con las concentraciones de los agentes suspensores, que son los encargados de aportar viscosidad al medio (carboximetilcelulosa sódica) y mantener las partículas separadas (Veegum), impidiendo la sedimentación de las mismas (Satya y Kumar, 2016).

Tabla 2. Resultados de pH y F.

Prueba fisico-química	ABZ-S	1 día	7 días	14 días	20 días	50 días
pH \pm SD	ABZ-S1	4,83 \pm 0,03	4,89 \pm 0,04	4,85 \pm 0,05	4,85 \pm 0,05	4,87 \pm 0,03
	ABZ-S2	5,29 \pm 0,03	5,31 \pm 0,04	5,33 \pm 0,03	5,31 \pm 0,04	5,34 \pm 0,02
*F	ABZ-S1	1	1	1	1	1
	ABZ-S2	1	1	1	1	0,97

*F=Volumen de sedimentación

Las partículas del fármaco se encontraban dispersas en el medio y no se depositaron en el fondo del recipiente que las contenía. Este comportamiento resulta ideal ya que el fármaco tiene una distribución más homogénea en todo el volumen del sistema, por lo cual se puede

distribuir la dosis de forma más exacta y estéticamente resulta más agradable, esto en correspondencia con el factor de sedimentación obtenido a los 51 días para la ABZ-S1, lo que indicó que el 100% del volumen total de la probeta estaba aparentemente ocupado por los flóculos que forman el sedimento; en la ABZ-S2, el 97% del volumen total de la probeta estaba aparentemente ocupado por los flóculos que forman el sedimento (Gennaro y Remington, 2009; Satya y Kumar, 2016).

Los porcentajes de fármaco cuantificados en las formulaciones fueron los siguientes: ABZ-S1=93,3%±0,98 y ABZ-S2 =88,41%± 0,16. El resultado obtenido para ABZ-S2 mostró porcentajes de cuantificación dentro de los límites indicados en la USP 35 (entre 90% y 110%). Lo contrario ocurrió con el porcentaje de fármaco de la ABZ-S2, la cual presentó valores inferiores, esto probablemente se debe a la mayor viscosidad que posee, dificultando la liberación del fármaco.

La ABZ-S2 fue la que mostró mayor viscosidad (promedio): 70,88 ± 0,88 mPa.s; y la viscosidad (promedio) de ABZ-S1 fue de 44,88 ± 0,33 mPa.s. La diferencia podría estar dada por los contenidos de glicerina (mayor para la ABZ-S2) y de agua (mayor para la ABZ-S1), esta última diluye el sistema y hace que pierda viscosidad (Tabla 3).

La figura 1 muestra los reogramas obtenidos en los ensayos de cada una de las formulaciones de ABZ-S. Se observa un comportamiento muy similar entre las dos formulaciones. En todos los casos se apreció que las suspensiones fluyeron inmediatamente que comenzó a aplicarse el esfuerzo cortante o de cizalla, describiendo una curva que prácticamente sale del origen del gráfico. Además, mostraron un comportamiento tixotrópico, dado por la disminución de la viscosidad aparente al ir aumentando la intensidad del esfuerzo cortante aplicado. Las dos formulaciones evaluadas poseen flujo pseudoplástico. Esto se comprobó al aplicar la ecuación de Cross y obtener valores de $r=1$ (Rojas, 2013).

Tabla 3. Resultados del análisis reológico de las ABZ-S.

ABZ-S	Ensayo 1				Ensayo 2			
	Tipo flujo	Tixotropía Pa/s	Ecuación de Cross	Visc. mPa.s	Tipo flujo	Tixotropía Pa/s	E. C.	Visc, mPa.s
ABZ-S1	Pseudo plástico	31.74	$r=1$	44.24 ± 0.34	Pseudo plástico	28.84	$r=1$	45.53 ± 0.30
ABZ-S2	Pseudo plástico	72.17	$r=1$	70.22 ± 0.92	Pseudo plástico	60.56	$r=1$	71.55 ± 0.84

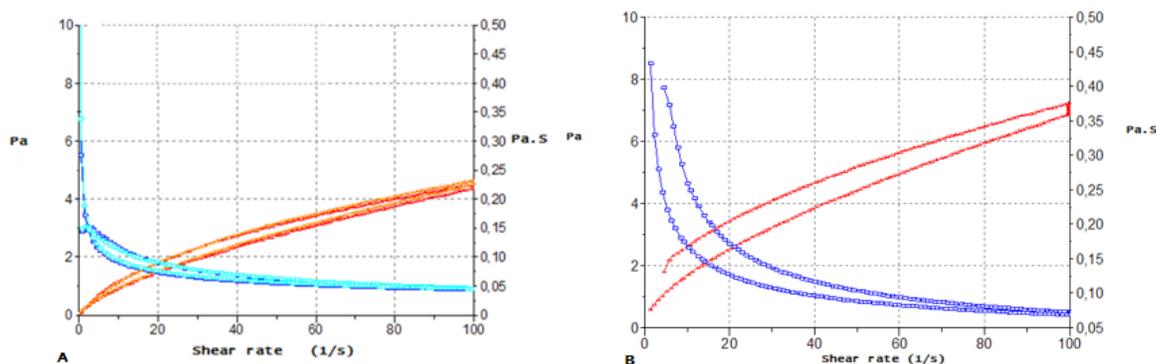


Figura 1. Reogramas de las suspensiones. A. ABZ-S1 y B. ABZ-S2.

El potencial Z es un indicador del potencial presente en la superficie de una partícula. De acuerdo con Pushkar y Lewis, cuando dicho potencial es de 30mv o más, las fuerzas de repulsión entre las partículas son mayores que las de atracción, por lo cual se dispersan generando sistemas desfloculados. Cuando las fuerzas de repulsión se encuentran disminuidas predominan las de atracción y las partículas se aproximan más entre sí formando agregados laxos o flóculos, generando sistemas floculados, con potencial Z menor a 30mv. Por lo cual, según Gennaro y Remington, los

altos potenciales zeta dan lugar a repulsiones electrostáticas significativas entre las partículas, esto se correlaciona con pequeños volúmenes de sedimentación y una difícil redispersión; lo contrario ocurre cuando el potencial zeta baja (Pushkary Lewis, 2011; Gennaro y Remington, 2009). Como se observa en la tabla 4, el potencial Z para las ABZ-S1 y ABZ-S2 es adecuado ya que ambas poseen valores menores a 30 mv. La ABZ-S1, que posee un potencial Z de $-41,40 \pm 1,37$, representa el potencial Z más estable y que justifica la razón de su volumen de sedimentación igual a 1 (F=1). Las dos ABZ-S son sistemas floculados.

Tabla 4. Tamaño de partícula, polidispersión y potencial Z de las ABZ-S.

ABZ-S	Tamaño de partícula	Polidispersión	Potencial Z mv
ABZ-S1	$7.60 \mu\text{m} \pm 1.29$	0.24 ± 0.12	-41.40 ± 1.37
ABZ-S2	$8.30 \mu\text{m} \pm 2.21$	0.14 ± 0.06	-36.00 ± 3.03

En relación al tamaño de partícula, ambas suspensiones poseen tamaños pequeños, como se observa en la tabla 3. El tamaño de partícula de la fase dispersa es muy importante debido a que influye directamente en la velocidad de sedimentación y la capacidad de floculación, que a la vez se relacionan con la sedimentación, el comportamiento de flujo y la redispersabilidad (Fernández et al., 2002). De acuerdo con esto, las dos ABZ-S presentaron óptimos tamaños de partícula y potenciales Z. Las ABZ-S1 y ABZ-S2 presentaron sistemas monodispersos.

Los estudios de estabilidad acelerada realizados con ayuda del Turbiscan™ LAB durante 24 horas a 25°C, demostraron que ninguna de las formulaciones presentó sedimentación, coalescencia, precipitación ni cremado. Se observan líneas perfectamente superpuestas sin ninguna variación entre ellas, lo cual indicó la monodispersión de sus partículas y la estabilidad física durante al menos 6 meses (figura 2).

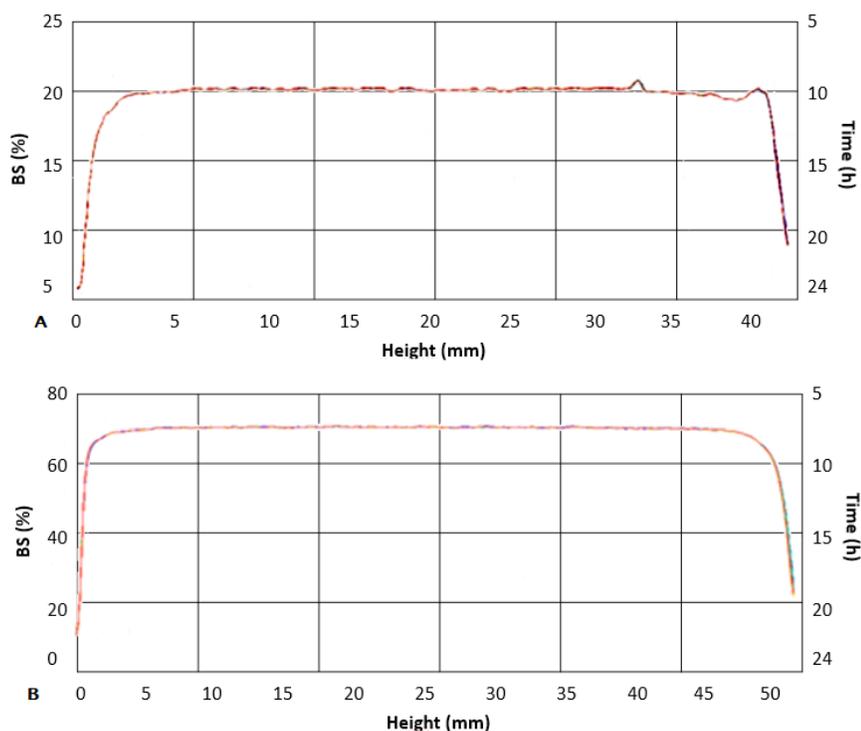


Figura 2. Gráficos de estudio de estabilidad acelerada mediante Turbiscan® Lab. A. ABZ-S1 y B. ABZ-2.

En relación con la validación del método analítico para la linealidad, el coeficiente de determinación r^2 fue de 0.9951, que cumple con el criterio $r^2 > 0,99$. El coeficiente de correlación fue de 0.9975, lo que indica una relación fuerte

entre las variables. El análisis de varianza (ANOVA) indicó un F_{cal} de 432.77 y un F_{tab} de 0.39, esto indica que se cumple con el criterio $F_{cal} > F_{tab}$ para un $p = 0,05\%$ de confianza, por lo que existe una elevada correlación lineal entre la respuesta analítica y las concentraciones analizadas. Para confirmar esta regresión lineal se aplicó la prueba de Student, cuyo valor de t_{cal} para intercepto y pendiente fueron -0.53 y 51.41, respectivamente. En el intercepto t_{cal} es menor que t_{tab} , para un 95% de confianza, por lo tanto, la pendiente es diferente de cero y el intervalo de confianza del intercepto incluye al cero, permitiendo excluir la significación del error del intercepto. Se demuestra con los resultados obtenidos la linealidad del sistema propuesto.

En el parámetro de precisión se determinó la repetibilidad del método y la precisión intermedia del mismo. En los estudios de la repetibilidad realizados a una misma muestra, a través de seis réplicas, se alcanzaron coeficientes de variación adecuados, lo que demuestra la buena precisión del método. Además, se observó una variabilidad de los resultados dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos, ya que el coeficiente de variación del método fue de 0,74%, cumpliendo con el criterio establecido ($C.V. < 2\%$). Para la precisión intermedia, el primer día se obtuvo un coeficiente de variación igual a 1,8% y el segundo día fue de 0,822%. En ambos casos se cumplió con el límite establecido para este ensayo ($C.V. < 2\%$). Para la prueba t de Student el valor de la t_{cal} fue de 2,09 y el de la t_{tab} de 2,23, de acuerdo con estos valores se llegó a determinar que t calculado es menor que t tabulado, para un 95% de confianza. Esto permitió demostrar que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación (α) igual a 0,05. Por tanto, se puede afirmar que el método tiene buena reproducibilidad intermedia. En ambos parámetros se constata que el método es repetible y reproducible, es decir, demuestra precisión.

En el parámetro de exactitud, para ninguno de los niveles de concentración se cumple con los porcentajes de recuperación obtenidos y, por ende, tampoco con los coeficientes de variación respectivos, ya que los porcentajes de recuperación se encuentran fuera del rango de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98%-103%). En cuanto a la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud, al aplicar la prueba de Cochran, con un 95% de confianza, se obtuvo que el G calculado es mayor que el G tabulado, lo que indica que las varianzas de las tres concentraciones no son equivalentes, hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas de cada una de las concentraciones ensayadas, con un nivel de confianza

del 95,0%. Esto infringe una de las asunciones importantes que subyacen en el análisis de la varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas paramétricas. Por ende, las recuperaciones no son satisfactorias y el factor de concentración influye en la variabilidad de los resultados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los criterios evaluados llevaron a determinar que el parámetro de exactitud no se cumple, por lo cual se puede decir que el método fue afectado por errores sistémicos de forma significativa y los valores experimentales no fueron próximos al valor verdadero. Para la especificidad, se evidencia la coincidencia en los tiempos de elución de los picos cromatográficos del estándar en la muestra de ABZ-S y de placebo, con lo que se verificó que el método es capaz de dar respuesta única frente a la sustancia de interés sin la interferencia de otros componentes (ver figura 4). Esto permite evidenciar que, aunque el parámetro de exactitud no se cumple, en este resultado no hay influencia de los excipientes, demostrando que el método de cuantificación es específico.

Existen otros trabajos que también utilizan el método de farmacopea -que han sido validados- para cuantificación de ABZ usando la técnica de HPLC no solo en suspensiones de ABZ para uso humano, sino que para uso veterinario. Ambas son formas farmacéuticas que requieren para su cuantificación métodos confiables que contribuyen al control de calidad y seguridad de estos tipos de preparados farmacéuticos, y que para su validación siguieron la normativa de la ICH. En dichos trabajos se obtuvieron resultados que también demuestran linealidad en la curva estándar de calibración, además de precisión y exactitud. De acuerdo con los parámetros, el método tiene linealidad, exactitud y precisión (repetibilidad y reproducibilidad intermedia) (Tavares Cavalcanti et al., 2012).

Referente a los ensayos microbiológicos, no se observó crecimiento de microorganismos en ninguno de los medios de cultivo a las 48 horas después de haber realizado la siembra de las materias primas. Tampoco se observó crecimiento en las placas para bacterias, mohos y levaduras. En todos los casos el número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue inferior a 10 por mililitro. En las placas en las cuales se realizó la siembra de las muestras de ABZ-S1 y ABZ-S2, para el aislamiento de microorganismos aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras, no se presentó crecimiento de microorganismos bajo ninguna de las condiciones ensayadas. En todos los casos las UFC resultaron inferiores a 10 UFC/mL. Este resultado que satisface las exigencias establecidas para productos farmacéuticos no estériles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albonico, M., Levecke, B., LoVerde, P.T., Montresor, A., Prichard, R., Vercruyse, J., Webster, J.P. (2015). Monitoring the efficacy of drugs for neglected tropical diseases controlled by preventive chemotherapy. *Journal Global Antimicrobial Resistance*, 3, 229-236.
- Ernest, T.B., Elder, D.P., Martini, L.G., Roberts, M., Ford, J.L. (2007). Developing paediatric medicines: identifying the needs and recognizing the challenges. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59 (8):1043–1055
- Fernández Valdés, O., Rodríguez Orjales, I., Cordovés, Y.R. (2002). Comparación de los parámetros tecnológicos de una suspensión farmacéutica con variación en las técnicas de preparación. *Revista Cubana de Farmacia*, 36(1), 35–41.
- Gennaro, A.R, Remington, J.P. (2009). *Remington // Remington farmacia: Farmacia*. Buenos Aires: Médica panamericana; Editorial Médica Panamericana.
- ICH. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf [Consultado en junio 20, 2018].
- Kaminsky, R.G., Valenzuela, R., Abrego, C. (2015), Growth retardation and severe anemia in children with Trichuris and mesenteric syndrome. *Asian Pacific Journal and Tropical Biomedicine*, 5:591-597
- Kumar, R., Sharma, R., (2015). Formulation and evaluation of albendazole suspension. *International Journal of Pharma Professional*, 6(3): 1249-1251.
- Matamoros, G., Schultz, J., Fontecha, G., Sánchez, A. (2017). Persistencia de los geohelminths en Honduras: pobreza, baja eficacia del tratamiento y potencial emergencia de resistencia parasitaria. *Investigación Clínica*, 58 (4), 393-405.
- OPS. (2018). Comienza la segunda ronda de la Campaña Nacional de Desparasitación de Escolares: “Estudiemos felices sin lombrices”. https://www.paho.org/hon/index.php?option=com_content&view=article&id=1597:comienza-la-segunda-ronda-de-la-campana-nacional-de-desparasitacion-de-escolares-estudiemos-felices-sin-lombrices&Itemid=229.
- Provenza, N., Calpena, A., Mallandrich, M., Halbut, L., Clares, B. (2014). Desing and physicochemical and reléasestudies of four alcohol free spironolactone suspension for use in pediatrics. *Dissolution Technologies*, 21(1), 19–30.
- Pushkar, S., Lewis, S.A. (2013). Stability of marketed albendazole suspensions and correlation between zeta potential and sedimentation. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(3), 154–156.
- RTCA (2010). Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los productos farmacéuticos. <https://medicamentos.mspas.gob.gt>
- Rojas N. (2013). Modelación de la ecuación constitutiva de suspensiones de Caolín en función de la energía libre superficial del mineral. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Samra-Vázquez, J., Soto, R., Alger-Pineda, J. (2000). Estudio comparativo de la eficacia y seguridad del albendazol versus metronidazol en el tratamiento de la Giardiasis infantil en el hospital Escuela, Tegucigalpa. *Revista Medica Post UNAH*, 5(3).
- Satya, T.N., Kumar, R.S. (2016). Pharmaceuticalsuspensions: patientcompliance oral dosage forms. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(12), 14711537.
- Tavares, N.C., Damasceno, G., Maciel, M.A., Soares, J.L, Bastos, L., Pereira de Santana, D. (2012). Assay and physicochemical characterization of the antiparasitic albendazole. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(2), 281–290.
- Townsend, L.B., Wise, D.S. (1990). The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6 (4): 107-112.
- USP. Farmacopea de los Estados Unidos de América; (2012). USP 35 NF 30 (35th ed., Vol. 2). Washington D.C. Estados Unidos de América.
- Verrest, L., Dorlo, T.P.C. (2017). Lack of clinical pharmacokinetic studies to optimize the treatment of neglected tropical diseases: a systematic review. *Clin Pharmacokinetics*, 56, 583-606.