



## Caracterización y estudio de estabilidad de fórmulas magistrales líquidas de administración oral

Nora Provenza Bernal

**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.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

**CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE  
FÓRMULAS MAGISTRALES LÍQUIDAS DE  
ADMINISTRACIÓN ORAL**

NORA PROVENZA, 2014





UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL  
DE MEDICAMENTOS

CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE FÓRMULAS  
MAGISTRALES LÍQUIDAS DE ADMINISTRACIÓN ORAL

Memoria presentada por Nora Provenza Bernal para optar al título de doctor por la  
Universidad de Barcelona

Directores

Dra. Ana Calpena Campmany

Dra. Beatriz Clares Naveros

Doctoranda

Nora Provenza Bernal

Tutor

Dra. Ana Calpena Campmany

NORA PROVENZA BERNAL, 2014



*A mis padres,  
que siempre encuentran su felicidad en la mía.  
Os quiero!*



*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”.*

*Mahatma Gandhi.*





# AGRADECIMIENTOS

---



Por fin! Cuantas veces pensé que este momento no llegaría jamás!!

Durante esta etapa de mi vida, son muchas las personas que han estado a mi lado, especialmente en los momentos en los que creí que esto nunca sería posible, y que han contribuido a que hoy esté escribiendo estas líneas.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis Directoras de Tesis, la Dra. Ana Calpena y la Dra. Beatriz Clares, por creer en este proyecto, por haberme dado la oportunidad de trabajar con vosotras y por haberme guiado. Gracias por el tiempo, las ideas, los consejos, por no dejarme abandonar y sobre todo, por vuestra amistad. Juntas hacéis un buen equipo.

No me puedo olvidar tampoco de la Dra. Lyda Halbaut ni de la Dra. M<sup>a</sup> Antonia Egea por su ayuda desinteresada y por aportar un valor añadido a este proyecto.

Gracias al Instituto Tecnológico del Medicamento Individualizado (ITMI) por el apoyo al inicio de esta aventura.

A todos los alumnos tanto de Trabajo Dirigido, como de Trabajo de Fin de Máster que participaron en este proyecto.

A mis compañeras de departamento (Mireia, Roser, Aroha, Ana...) con las cuales he compartido incontables horas de trabajo, haciendo y haciendo diluciones y delante del HPLC rezando para que el pico saliera donde tenía que salir. Gracias por las risas y los buenos momentos, y gracias también por escucharme en los no tan buenos.

A mis compañeros de trabajo, que de algún modo también han sufrido “mis jarabitos”, especialmente en esta última etapa.

A mis amigos (los de antes y los nuevos), a mis ex-compañeras de piso; a todos ellos, gracias por perdonar el histerismo y los plantones; y adaptaros a mis extraños horarios durante estos años. Una mención especial a Marie por su comprensión y sabios consejos a pesar de estar, literalmente, al otro lado del mundo.

Y por supuesto, a mis padres, Antonio y Conchi, por hacer que os sintiera aquí cerquita aun estando lejos. Creo que decir gracias, es poco. Sin vuestro amor y apoyo incondicional (antes, ahora y siempre) probablemente no me habría convertido en lo que soy ahora. Este doctorado también es vuestro.



# ÍNDICE GENERAL

---



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1. Farmacocinética y Farmacodinamia en pediatría</b>	<b>7</b>
1.1. Desarrollo y maduración	7
1.2. Farmacocinética	8
1.2.1. Absorción	9
1.2.2. Transpote y distribución	12
1.2.3. Metabolismo	15
1.2.4. Eliminación	18
1.3. Farmacodinamia	20
<b>2. Marco regulatorio en materia de medicamentos pediátricos</b>	<b>21</b>
2.1. Estados Unidos	21
2.2. Unión Europea	22
<b>3. Patologías frecuentes en pediatría</b>	<b>25</b>
3.1. Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido	25
3.1.1. Descripción/Sintomatología	25
3.1.2. Causas/Etiología	26
3.1.3. Incidencia	27
3.1.4. Tratamiento	27
3.2. Insuficiencia Cardíaca Congestiva	29
3.2.1. Descripción/Sintomatología	29
3.2.2. Causas/Etiología	30
3.2.3. Incidencia	30
3.2.4. Tratamiento	31
3.3. Síndrome de Abstinencia Neonatal	32
3.3.1. Descripción	32
3.3.2. Incidencia	33
3.3.3. Tratamiento	33
3.4. Epilepsia /Convulsiones	34
3.4.1. Descripción e Incidencia	34



3.4.2. Tratamiento	35
<b>4. Papel de la formulación magistral en pediatría</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b>	<b>41</b>
<b>Objetivos y Plan de Trabajo</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>1. Design and physicochemical stability studies of paediatric oral formulations of sildenafil</b>	<b>51</b>
<b>2. Development, physical-chemical stability, and release studies of four alcohol-free spironolactone suspensions for use in pediatrics.</b>	<b>59</b>
<b>3. Development of a spectrofluorometric method for the determination of furosemide in oral solutions for paediatric use.</b>	<b>73</b>
<b>4. Development and stability study of two novel oral pediatric solutions of furosemide using three analytical techniques and the prediction of its permeability through pig small intestine.</b>	<b>77</b>
<b>5. Development and stability study of solutions containing methadone or phenobarbital for the treatment of Neonatal Abstinence Syndrome</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN</b>	<b>115</b>
<b>Discusión</b>	<b>117</b>
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES</b>	<b>137</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>139</b>
<b>CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL</b>	<b>143</b>
<b>Bibliografía Adicional</b>	<b>145</b>
<b>ANEXO I. OTROS MÉRITOS</b>	<b>159</b>
<b>Premio. Estudio de fórmulas magistrales líquidas orales para uso pediátrico</b>	<b>165</b>
<b>Relación de Comunicaciones en forma de póster y Comunicaciones orales</b>	<b>183</b>

# **ABREVIATURAS**

---



## Abreviaturas

AAG	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida
AIC	Criterio de Akaike
AMP	Adenosín monofosfato
API	Sustancia activa
AUC	Área bajo la curva
BPCA	<i>Best Pharmaceuticals for Children Act</i>
BS	Backscattering o retrodispersión
CFBN	Convulsiones familiares benignas
Cl	Aclaramiento
C <sub>max</sub>	Concentración máxima
CMC	Carboximetilcelulosa
C <sub>p</sub>	Concentración plasmática
CYP	Citocromo P450
DE	Eficiencia de disolución
EEG	Electroencefalograma
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPBI	Epilepsia Parcial Benigna de la Infancia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDASIA	<i>Food and Drug Administration Safety and Innovation Act</i>
GMP	Guanosin Monofosfato
HDC	Hernia diafragmática congénita
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPPN	Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido
IC	Insuficiencia Cardíaca
ICC	Insuficiencia Cardíaca Congestiva
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
FUR	Furosemida
LD	Difracción de laser
MDT	Tiempo Medio de Disolución
ON	Óxido Nítrico
ONi	Óxido Nítrico Inhalado
PBS	Tampón Fosfato Salino

## Abreviaturas

PC	Peso corporal
PDE5	Fosfodiesterasa tipo 5
Pe <sub>ff</sub>	Permeabilidad efectiva
PEG	Polietilenglicol
PIP	Plan de Investigación Pediátrica
pK <sub>a</sub>	Constante de disociación ácida
PO <sub>2</sub>	Presión de Oxígeno
PREA	<i>Pediatric Research Equity Act</i>
PSD	Distribución del tamaño de partícula
PUMA	Autorización de Comercialización de Uso Pediátrico
RVP	Resistencia Vascular Pulmonar
SAN	Síndrome de Abstinencia Neonatal
SLD	Sildenafil citrato
SNC	Sistema Nervioso Central
t <sub>1/2</sub>	Vida media
TFG	Filtración Glomerular
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
V <sub>d</sub>	Volumen de distribución

# **CAPÍTULO I.**

## **INTRODUCCIÓN**

---



## 1. FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA EN PEDIATRÍA

La prescripción de los fármacos se debe basar en el conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del individuo al que van dirigidos: La *farmacocinética* es la rama de la farmacología que estudia el paso de los fármacos a través del organismo, es decir, los procesos de absorción, distribución, transporte, metabolismo y excreción de los fármacos; y la *Farmacodinamia* estudia los efectos farmacológicos de los fármacos y el mecanismo de acción de los mismos a nivel molecular (Malgor y Valsecia, 2000).

Los niños no son adultos pequeños. Las diferencias en la fisiología durante el desarrollo influyen en la forma en la que los medicamentos se absorben, distribuyen, metabolizan y eliminan, y no se pueden predecir a partir de datos en adultos (Standing y Tuleu, 2005).

### 1.1. Desarrollo y maduración

La *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* (ICH, 2000), considerando los complejos cambios y diferencias en la anatomía, bioquímica y fisiología en el comportamiento y maduración del sistema nervioso central (SNC) y numerosos sistemas orgánicos dependientes de la edad, ha dividido la población pediátrica en 5 grupos de edad, siendo:

1. Prematuros neonatos
2. Neonatos nacidos a término: desde el nacimiento hasta un mes (de 0 a 27 días).
3. Infante: desde un mes hasta 2 años (de 28 días a 23 meses).
4. Niño: desde 2 años hasta el comienzo de la pubertad (de 2 a 11 años).
5. Adolescente: desde el comienzo de la pubertad hasta la vida adulta (de 12 años a 16-18 años).

Cada uno de estos subgrupos de edad tiene sus propias características y a veces no coinciden completamente con la maduración de algunos órganos. Por ejemplo, la maduración del hígado ocurre principalmente en el infante y se concluye hacia los 3-4 años de edad, aunque el grupo de los infantes sólo abarca hasta los 2 años de edad.



Las principales diferencias funcionales (dinámicas) entre la población pediátrica y los adultos, han sido objeto de diversas publicaciones. En resumen, estos documentos muestran que los sistemas nervioso, pulmonar, esquelético e inmune entre otros, presentan una maduración y un desarrollo postnatal importantes (Baldrick, 2004; CDER, 2006).

- *Sistema renal*: el desarrollo completo de este sistema se alcanza hacia el primer año de edad (Travis, 1991).
- *Sistema nervioso*: su desarrollo empieza durante el primer trimestre del embarazo, aunque el desarrollo neural continúa hasta la adolescencia (Rice y Barone, 2000).
- *Sistema reproductor*: madura lentamente hasta alcanzar su pico máximo justo antes de la fase adulta (Beckman y Feuston, 2003; Marty y cols., 2003).
- *Sistema pulmonar*: la completa maduración alveolar ocurre durante los primeros 2 años de vida (Burri, 1997).
- *Sistema inmune*: se desarrolla después del parto. Los niveles de respuesta de algunas inmunoglobulinas detectadas en los adultos, no se alcanzan hasta los 12 años de edad (Holladay y Smialowicz, 2000).
- *Sistema esquelético*: su desarrollo finaliza una vez que se alcanza la edad adulta (Zoetis y cols., 2003).
- *Sistema gastrointestinal*: puede tener consecuencias directas en la biodisponibilidad, aclaramiento y biotransformación de los fármacos y está funcionalmente maduro sobre el primer año de edad (Walthall y cols, 2005).

### **1.2. Farmacocinética**

El desarrollo de un niño desde su nacimiento hasta la edad adulta es un proceso continuo, pero no uniforme, que puede modificar las funciones orgánicas e incluso a la propia composición corporal, y como consecuencia afecta a la farmacocinética y a la farmacodinamia de los fármacos, así como a la dosificación y la respuesta de éstos.

En la Tabla 1 se muestran las diferencias en los factores de disposición (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) entre neonatos y adultos; los parámetros farmacocinéticos alterados, como el área bajo la curva (AUC), la concentración máxima (C<sub>máx.</sub>) o la vida media (t<sub>1/2</sub>); así como algún ejemplo de fármaco alterado.

Factores de disposición	Neonato (vs adulto)	Parámetros cinéticos	Ejemplos de fármacos
Absorción	↓	↓ AUC	Penicilinas, sulfonamidas
Volumen de distribución	↑	↓ C <sub>máx</sub>	Digoxina, gentamicina
% de unión a proteínas plasmáticas	↓	↑ Fracción libre	Clindamicina, teofilina
Metabolismo	↓	↓ Aclaramiento	Cloranfenicol, teofilina
Excreción	↓	↑ t <sub>1/2</sub>	Gentamicina, furosemida

**Tabla 1:** Diferencias entre neonatos y adultos en los factores de disposición, parámetros farmacocinéticos afectados y ejemplos de fármacos (Govantes-Betes y cols, 2006).

### 1.2.1. Absorción

La mayoría de los fármacos se administran por vía extravascular, de forma que todos los cambios madurativos que se produzcan en las superficies de absorción, tales como el tracto gastrointestinal, la piel y el árbol pulmonar, pueden influir en la velocidad y la biodisponibilidad de los mismos (Fernandez y cols, 2011).

Absorción gastrointestinal: La mayor parte de los fármacos usados en pediatría se administran por vía oral y se absorben por difusión pasiva a nivel del tracto gastrointestinal. Algunas de las variables que pueden influir en la velocidad y la cantidad de fármaco absorbido son:

- *pH gástrico:* el pH afecta directamente a la estabilidad y el grado de ionización de los fármacos, influyendo en la cantidad que estará disponible para ser absorbida. Durante el período neonatal, el pH gástrico es prácticamente neutro (entre 6 y 8), debido a que hay una disminución en la producción de ácido y en el volumen de secreciones gástricas, después cae a aproximadamente 1-3 durante las primeras 24h y vuelve a la neutralidad hacia el día 10 (Moreselli y cols., 1980; Bartelink y cols., 2006). A partir de entonces, disminuye lentamente hasta alcanzar los valores del adulto. A la edad de tres años, la cantidad de ácido gástrico excretada por kilogramo de peso es similar a la excretada en adultos y por tanto el valor de pH es similar (2-3).

Las diferencias en la acidez gástrica pueden afectar a la disolución y absorción de los fármacos:

- Los fármacos básicos se absorben más rápidamente que en los adultos (Bartelink y cols., 2006).
- Los ácidos orgánicos débiles como la fenitoína y el fenobarbital tienen una absorción disminuida (Strolin-Benedetti y Baltes, 2003).
- *Vaciamiento gástrico y motilidad intestinal:* determinan el ritmo al que los fármacos se dispersan sobre la superficie de la mucosa intestinal.

En adultos normales, el vaciado gástrico es bifásico; una primera fase rápida (10-20 min) seguida por una fase exponencial más lenta (Koren, 1997). En el recién nacido prematuro, el vaciado gástrico es lento y lineal, alcanzando valores del adulto dentro de los primeros 6-8 meses de vida (Morselli y cols., 1980; Butler y cols., 1994). Sería de esperar que los fármacos presentaran una mejor absorción en los niños pequeños, debido al contacto prolongado con la mucosa gastrointestinal y un vaciamento gástrico más lento. Sin embargo, los datos sugieren que ciertos fármacos, incluyendo la amoxicilina, la rifampicina y el cloranfenicol, demuestran retraso y una absorción incompleta en recién nacidos y lactantes (Meissner y Smith, 1979; Acocella, 1978; McCracken y cols., 1978).

El tránsito intestinal se prolonga en los recién nacidos debido a una motilidad y peristaltismo reducidos, pero parece estar reducido en lactantes mayores como resultado de aumento de la motilidad intestinal y esto parece ser el responsable, junto con otros factores, de la absorción incompleta de algunas formulaciones de liberación sostenida, como ha sido ampliamente demostrado para la teofilina (Strolin-Benedetti y Baltes, 2003).

- *Función biliar:*

La inmadurez de la secreción y actividad biliar y los fluidos pancreáticos provoca la alteración de la digestión de grasas en los recién nacidos y lactantes en los primeros meses. La absorción de vitaminas liposolubles (vitamina D y E) se reduce en los recién nacidos (Strolin-Benedetti y cols., 2005). Este hecho debe ser tenido en cuenta cuando se administran sustancias grasas a los recién nacidos y los niños pequeños, precisándose un ajuste de dosis. Después de unos meses, el bebé es capaz de absorber de manera eficiente compuestos solubles en

grasa debido a una posnatal maduración de la sal biliar (Bohem y cols., 1997; Heubi y cols., 1982).

Absorción percutánea: está directamente relacionada con el grado de hidratación e inversamente relacionada con el grosor del estrato córneo (Koren, 1997).

En neonatos el estrato córneo no está formado completamente y el control vasomotor es inmaduro (Skinner, 2014). Este hecho, junto con una mayor área de superficie corporal en relación al peso, puede causar la absorción excesiva de un fármaco aplicado sobre la piel en recién nacidos y lactantes pequeños. Los datos de los estudios in vivo indican una correlación inversa entre la permeabilidad y la edad gestacional. Los recién nacidos a término tienen una velocidad de penetración 3-4 veces superior a la de los adultos (Ginsberg y cols., 2004). Estas características hacen que la exposición sistémica relativa de infantes y niños a fármacos aplicados tópicamente, como los corticoesteroides, antihistamínicos y antisépticos, pueda exceder a la de los adultos, provocando efectos tóxicos en algunas ocasiones.

Absorción intramuscular: la masa muscular, el volumen de tejido celular subcutáneo y el flujo sanguíneo en neonatos está reducido; además el contenido en agua del tejido muscular es elevado y las contracciones musculares son débiles (Koren, 1997; Strolin-Benedetti y cols., 2005). Todos estos factores provocan que la absorción por esta vía en neonatos esté reducida.

Absorción rectal: La administración rectal es una vía útil si el paciente no puede tomar medicamentos por vía oral y la administración intravenosa es difícil. El área del recto es pequeña pero bien vascularizada y la absorción se produce a través de las venas hemorroidales superiores, medias e inferiores. La vía rectal no se modifica mucho por la maduración. El pH local del recto es cercano a la neutralidad en los adultos, pero en la mayoría de los niños es alcalino (Strolin-Benedetti y Baltés, 2003). El efecto de primer paso puede tener alguna influencia en la biodisponibilidad de la administración rectal. Mientras que los fármacos administrados en la parte más baja del recto pasan a la circulación sistémica antes de seguir a través del hígado, los fármacos administrados en la parte alta del recto son generalmente transportados directamente al hígado y por lo tanto están sujetos a metabolismo y a la circulación enterohepática (American Academy

of Pediatrics, 1997). Por lo tanto, dependiendo del sitio de absorción del recto, la biodisponibilidad puede variar entre neonatos, lactantes, niños y adultos.

### 1.2.2. Transporte y distribución

Las características de distribución de un fármaco en el organismo son importantes para seleccionar la dosificación. Aunque el volumen de distribución (Vd) de un fármaco no corresponde a ningún volumen real fisiológico, la estimación de este parámetro permite prever la cantidad total presente en el organismo en relación a su concentración en sangre y la distribución tisular. En niños, si se conoce la concentración plasmática (Cp) y Vd promedio apropiado para la edad, se puede calcular la dosis inicial (LD) mediante la siguiente ecuación (Balboa de Paz y Rueda, 2004):

$$LD = Cp \left( \frac{mg}{L} \right) \times Vd \left( \frac{L}{kg} \right) \times peso \text{ del niño}$$

El proceso de distribución de un medicamento depende de varios factores como son la permeabilidad de la membrana, la composición corporal o la unión a proteínas plasmáticas, por lo que el valor del Vd para numerosos fármacos difiere marcadamente entre recién nacidos (prematuros vs nacidos a término), infantes y niños comparados con los adultos.

En el nacimiento, la barrera hematoencefálica no está completamente formada y por tanto, algunos medicamentos podrían acceder al SNC, lo que resultaría en efectos tóxicos. Este factor, junto con el hecho de que el cerebro es desproporcionadamente grande en los niños pequeños, provocan que el volumen del SNC sea relativamente grande en los niños más pequeños y que no se correlacione bien con el área de la superficie corporal en la población pediátrica (Fernandez y cols., 2011).

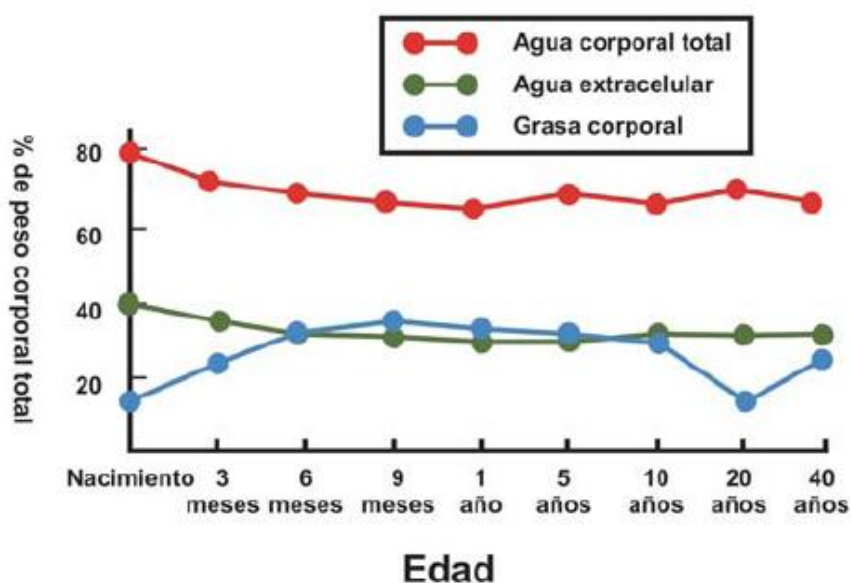
Se debe tener en cuenta, también, la composición corporal (Tabla 2), destacando que la cantidad de agua corporal total sufre grandes modificaciones a lo largo del desarrollo del niño (Figura 1).

	Prematuro	Neonato	Infante	Adulto
Agua corporal total	92%	75%	-	50-60%
Fluido extracelular	50%	45%	25%	20-25%
Grasa corporal	3%	12%	30%	18%

**Tabla 2:** Composición corporal durante el desarrollo.

En los neonatos prematuros o nacidos a término, el agua corporal total es alta (80-90% del peso corporal (PC)), mientras que el contenido en grasa es bajo (10-15% PC). La cantidad de agua corporal total disminuye hasta un 55-60% en la edad adulta (McLeod y cols., 1992; Rane y Wilson, 1976). El contenido de agua extracelular es de aproximadamente 45% en los recién nacidos, y especialmente grande en los recién nacidos con bajo peso al nacer, en comparación con el de la edad adulta (20%) (McLeod y cols., 1992).

Estos cambios darán lugar a un volumen de distribución relativamente alto de fármacos solubles en agua en población pediátrica en relación con la edad adulta (Fernandez y cols., 2011), lo que conlleva a un incremento de la dosis inicial a administrar (Skinner, 2014). Lo contrario ocurre con los fármacos liposolubles (Fernandez y cols., 2011) ya que la cantidad de grasa corporal está relacionada de manera directamente proporcional con la edad y por tanto serían necesarias menos dosis iniciales.



**Figura 1:** Evolución del agua corporal total, del agua extracelular y de la grasa corporal en función de la edad (Balboa de Paz y Rueda, 2004).

La unión a proteínas plasmáticas depende a su vez de varios factores como la cantidad de proteínas de unión disponibles, el número de sitios de unión disponibles, de la constante de afinidad del fármaco para la proteína (s), y de la presencia de condiciones fisiopatológicas o compuestos endógenos que pueden alterar la interacción del fármaco a la proteína.

En general, los fármacos ácidos se unen principalmente a la albúmina, mientras que los medicamentos básicos se unen a las globulinas, la  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (AAG) y las lipoproteínas (Strolin-Benedetti y cols., 2005). La intensidad con la que un fármaco se une a las proteínas circulantes plasmáticas influye directamente en sus características de distribución. Sólo la fracción libre es capaz de distribuirse desde el espacio vascular a otros fluidos corporales y tejidos, donde se unirá a los receptores y ejercerá su acción. Con frecuencia, la fracción de fármaco no unida a proteínas es mayor en recién nacidos y lactantes (Skinner, 2014) por varias razones.

En primer lugar, la concentración de proteínas de unión puede estar reducida, alcanzando valores semejantes a los del adulto hacia los 12 meses de edad (Kearns y cols., 2003; Routledge, 1994). Por este motivo, la concentración libre en aquellos fármacos que tienen una elevada unión a proteínas plasmáticas, en este grupo de edad estará aumentada, favoreciendo los efectos tóxicos en el organismo (Skinner, 2014). Por otra parte, estas proteínas son cualitativamente diferentes y generalmente tienen capacidades de unión inferiores, especialmente en los recién nacidos (Kearns y cols., 2003; Kurtz y cols., 1977). Además, en el periodo neonatal se encuentran con frecuencia aumentos fisiológicos y patológicos de la bilirrubina y de las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres. Algunos factores pueden reducir la unión del fármaco a las proteínas como por ejemplo un aumento de la concentración de ácidos grasos no esterificados, un aumento de los niveles de bilirrubina o un aumento de otras sustancias endógenas que se unen competitivamente a la albúmina (Rane y Wilson, 1976). Por este motivo es importante conocer el potencial de un fármaco para desplazar a la bilirrubina de los sitios de unión proteica antes de su administración en niños prematuros y recién nacidos

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas de fármacos de uso frecuente en pediatría.

	Recién nacido (%)	Niño (%)
<b>Antibióticos</b>		
Penicilina	65	85
Cefalotina	72	90
Cloranfenicol	46	66
<b>Anticonvulsivantes</b>		
Fenobarbital	28-43	48
Fenitoína	71-86	89
<b>Digitálicos</b>		
Digoxina	14-26	23-40
<b>Antihipertensivos</b>		
Propanolol	57	85
<b>AINE's</b>		
Ac. Acetilsalicílico	74	83
Paracetamol	37	48

**Tabla 3:** Unión a proteínas plasmáticas de algunos fármacos de uso frecuente en pediatría (Malgor y Valsecia, 2000).

### 1.2.3. Metabolismo

El hígado es cuantitativamente, el órgano más importante para el metabolismo de fármacos, constituyendo un 5 % del peso corporal al nacer y un 2 % en los adultos (Strolin-Benedetti y cols., 2007). El aclaramiento hepático depende de varios factores, incluyendo el flujo sanguíneo, la actividad de las enzimas hepáticas (metabolismo intrínseco), los sistemas de transporte y la unión a proteínas plasmáticas. El flujo sanguíneo y los enzimas capaces de metabolizar los medicamentos se encuentran reducidos en los niños, alcanzando las tasas de los adultos en el primer año de edad (Anderson y Lynn, 2009).

El objetivo principal del metabolismo de los fármacos es transformarlos en sustancias más solubles en agua para facilitar su eliminación. Este proceso se produce principalmente en los hepatocitos del hígado para generar metabolitos que generalmente son inactivos y relativamente no tóxicos; Sin embargo, los metabolitos pueden, ocasionalmente, ser la fuente de los efectos tóxicos (Fernandez y cols., 2011).

Los mecanismos del metabolismo de los fármacos pueden clasificarse en reacciones de fase I (oxidación, reducción e hidrólisis), que implican la alteración estructural de la



molécula del fármaco, y en reacciones de fase II, que consisten en la conjugación con otro elemento, a menudo más soluble en agua, aunque la mayoría muestran una actividad limitada durante la vida fetal.

La maduración para ambas fases ocurre en diferentes edades según los diferentes pasos metabólicos y puede ser específica para cada medicamento. En neonatos, la metabolización hepática está disminuida debido al bajo flujo sanguíneo hepático y a una menor capacidad enzimática y de excreción biliar. También está disminuida la captación celular y el transporte intrahepático de éstos. La diferente capacidad para metabolizar los medicamentos en los niños puede resultar en niveles plasmáticos de fármaco más altos o más bajos que los alcanzados en adultos (McLeod y cols., 1992).

De hecho, hay ejemplos de agentes terapéuticos que producen metabolitos en los niños que normalmente no están presentes en los adultos. Algunos de estos metabolitos pueden ser los responsables de la eficacia y/o de la toxicidad observada con la administración del fármaco en los niños. Un ejemplo es la producción de cafeína en los recién nacidos que recibieron teofilina (Strolin-Benedetti y cols., 2007). Otro ejemplo de esta problemática es el llamado Síndrome Gris o colapso cardiovascular ocurrido en recién nacidos y prematuros por el uso de cloranfenicol (Skinner, 2014) a dosis normales para otros grupos de edad (75-100 mg/kg/24h). Cuando las dosis se corrigieron teniendo en cuenta la capacidad hepática de glucoronidación disminuida en neonatos, se comprobó que la dosis eficaz era de 15-50 mg/kg/24h.

Las reacciones oxidativas son las más importantes y con frecuencia, aunque no necesariamente, son citocromo P450 (CYP)-dependientes.

El sistema oxidasa P-450, presenta al nacimiento un contenido aproximado del 28% del adulto, alcanzando los valores del adulto a los 10 años de edad (de Wildt y cols., 2003), lo que produce una disminución del aclaramiento de ciertos medicamentos (ej. teofilina, cafeína diazepam, fenobarbital, fenitoina, ácido valproico, teofilina, indometacina y metronidazol).

La oxidasa citocromo P450 está clasificada en tres grupos (CYP1, CYP2 y CYP3) que presentan diferente progreso de maduración (Skinner, 2014) por lo que el metabolismo

del fármaco dependerá de la isoforma que actúa sobre este. A continuación se presentan algunos ejemplos:

*CYP1A*: Esta subfamilia consiste en dos isoformas, la *CYP1A1* y *1A2*. Esta última está implicada en el metabolismo de la cafeína y la teofilina y apenas se detecta hasta los tres meses de edad. Esto hace que el aclaramiento de la cafeína esté disminuido en neonatos alcanzando los valores del adulto a los 5-6 meses de vida (Cazeneuve y cols., 1994). El aclaramiento de la teofilina es aproximadamente el 50 % del valor del adulto en neonatos, luego aumenta por encima del 50% del aclaramiento en el adulto a los cinco años y finalmente disminuye hasta alcanzar el valor del adulto a los 15 años (Bjorkman, 2005). *CYP1A2* ocupa aproximadamente el 13% de la expresión total del citocromo P-450 en el adulto sano (de Wildt y cols., 2003).

*CYP2C*: Las isoenzimas de la subfamilia *CYP2C* están implicadas en el metabolismo de un gran número de agentes terapéuticos como anticonvulsivantes, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, omeprazol, warfarina, tolbutamida, diacepan, propranolol y algunos agentes endógenos como el ácido araquidónico (Benedetti, 2007). Las isoenzimas más relevantes son la *CYP2C9*, *2C19* y la *2C8*. Las isoenzimas *CYP2C* apenas se detectan en neonatos; representan un tercio del valor del adulto en el primer mes de vida y permanecen inalteradas hasta el primer año de edad (Treluyer y cols., 1997).

*CYP3A*: es el citocromo más abundante en el hígado humano y en el tracto gastrointestinal, siendo aproximadamente de un 30-40% del citocromo hepático total (Anderson y Lynn, 2009). Probablemente es esencial para el metabolismo de hormonas esteroideas que provienen de la madre, de la placenta o del adrenal fetal (Strolin-Benedetti y cols., 2005) y del metabolismo de más del 50% de los fármacos incluyendo ciclosporina, tacrolimus, cisaprida, midazolam, fentanilo, lidocaína, nifedipino, indinavir, verapamilo (Anderson y Lynn, 2009; de Wildt y cols., 2003). El *CYP3A* se desarrolla en etapas muy tempranas.

La tabla 4 muestra las diferentes vidas medias de los fármacos metabolizados por las isoenzimas del *CYP450* entre los recién nacidos, bebés, niños y adultos (Fernandez y cols., 2011).

Isoenzima	Fármaco	Neonato	Infante	Niño	Adulto
CYP1A2	Cafeína	95	7	3	4
	Teofilina	24-36			3-9
CYP3A	Carbamacepina	8-28	-	14-19	16-36
	Lidocaína	2,9-3,3	-	1-5	1,0-2,2
CYP2C9	Fenitoína	30-60	2-7	2-20	20-30
CYP2C19	Fenobarbital	70-500	20-70	20-80	60-160
	Diazepam	22-46	10-12	15-21	24-48

**Tabla 4:** Diferencias en la vida media (horas) de diversos fármacos metabolizados por diferentes isoenzimas del Cit. P-450 entre neonatos, lactantes, niños y adultos (Fernandez y cols., 2011).

Por tanto, los procesos metabólicos no están linealmente relacionados con el peso del cuerpo (alometría) y por ello, reducir las dosis usadas en el adulto de una manera proporcionalmente directa conllevará resultados de bajas dosis en los niños (Skinner, 2014).

#### 1.2.4. Eliminación

El aclaramiento (Cl) es el parámetro farmacológico que estima el volumen de eliminación de un fármaco por unidad de tiempo. El Cl corporal total es la suma de todos los Cl (renal, hepático y pulmonar).

La eliminación renal es dependiente de tres procesos: filtración glomerular (TFG), la secreción tubular y la reabsorción. Estos, dependen a su vez, del flujo sanguíneo renal y del flujo plasmático renal, que aumentan con la edad como resultado de un aumento en el gasto cardíaco y una reducción en la resistencia vascular periférica (Fernandez y cols., 2011).

Al nacer, el flujo sanguíneo renal es sólo del 5 al 6% del gasto cardíaco, del 15 al 25 % en un año de edad y alcanza valores de los adultos después de dos años de edad (Alcorn y McNamara, 2002).

Aunque durante el período neonatal la eliminación de muchos de los medicamentos que se excretan en la orina en forma inalterada está restringida por la falta de madurez de la

filtración glomerular y secreción tubular renal, a finales de la lactancia y/o en la infancia, se observa una tasa de eliminación del plasma similar o mayor que en los adultos para muchos medicamentos, incluyendo la digoxina, fenitoína, carbamazepina, levetiracetam, diazóxido, clindamicina, cimetidina, clorfeniramina y cetirizina (Patsalos, 2004; Somogy y cols., 1985; Hunt y cols., 1999; Chae y Michael., 2000). Por lo tanto, se requerirán dosis más altas de estos fármacos (mg/kg) en los niños con el fin de alcanzar las mismas concentraciones de plasma que en adultos. La explicación de la relación dosis-concentración plasmática más baja en lactantes y niños es variable, pudiendo ser debido a un número de fenómenos relacionados ya sea con la función renal (tal como un aumento de la capacidad de secreción tubular) o no directamente relacionado con la función renal (por ejemplo, menor unión a proteínas plasmáticas, tejido de unión más extenso, un aumento de la actividad metabólica hepática, etc).

Por otro lado, los valores de pH urinario infantil son generalmente inferiores a los valores de adultos (Alcorn y McNamara, 2002). El valor del pH urinario puede influir en la reabsorción de ácidos y bases orgánicas débiles. Las diferencias en la eliminación renal del fármaco pueden reflejar la discrepancia en los valores de pH urinario.

La inulina o creatinina se utilizan a menudo como marcadores de la filtración glomerular. La inulina tiene menor concentración en el nacimiento, aumenta considerablemente durante las dos primeras semanas de vida y alcanza los niveles de adultos a los seis meses (Alcorn y McNamara, 2002). Sin embargo, cada marcador tiene sus propias limitaciones; por ejemplo, durante los primeros días de vida, cierta cantidad de la creatinina en el plasma puede provenir de la madre y el aclaramiento de esta puede no corresponder con exactitud a la TFG (Rhodin y cols., 2009). En la Tabla 5 se muestra la relación del aclaramiento de creatinina con la edad.

Edad	Aclaramiento de creatinina (ml/min/m <sup>2</sup> )
Prematuros	5-10
Prematuros (1-2 semanas)	10-12
Neonatos	10-15
1-2 semanas de edad	20-30
6 meses	20-30
Adultos	73

**Tabla 5.** Relación del aclaramiento de creatinina con la edad (Fernandez y cols., 2011).

Para los medicamentos cuyo aclaramiento renal se rige por la filtración glomerular, la rápida mejora en la eficiencia de la filtración glomerular conduce a la mejora rápida en la depuración renal de los fármacos y a un menor riesgo de acumulación significativa del fármaco, como los aminoglucósidos (Zarowitz y cols., 1992).

La capacidad de la secreción tubular renal aumenta durante los primeros meses de vida para alcanzar el nivel adulto en aproximadamente siete meses (Strolin-Benedetti y cols., 2005). Por lo tanto, la secreción tubular activa tarda algo más de tiempo en alcanzar los valores del adulto que la filtración glomerular. La secreción tubular puede ser mayor en los niños y adolescentes que en los adultos.

### **1.3. Farmacodinamia**

La farmacodinamia comprende el estudio del mecanismo de acción de los fármacos y de sus efectos bioquímicos, fisiológicos y/o farmacológicos. El mecanismo de acción de los fármacos se estudia a nivel molecular y la farmacodinamia analiza cómo una molécula de un determinado fármaco o sus metabolitos interactúan con otras moléculas para producir una respuesta (efecto farmacológico).

En farmacodinamia es fundamental el concepto de receptor farmacológico, sin embargo los receptores no son las únicas estructuras que tienen que ver con el mecanismo de acción de los fármacos. Los fármacos también pueden actuar por otros mecanismos como por ejemplo interacciones con enzimas o a través de sus propiedades fisicoquímicas (Malgor y Valsecia, 2000).

No se sabe con exactitud el estado de los receptores farmacológicos al nacer. Por tanto, existen diferencias farmacodinámicas en relación a la edad que todavía están por dilucidar. El conocimiento del estado de maduración de los receptores adrenérgicos en algunas patologías podría tener gran importancia terapéutica, sobretodo en fármacos que actúan sobre el SNC. La dificultad en la interpretación de los puntos clínicos finales en neonatos hace que la relación entre la concentración plasmática y el efecto clínico sean difíciles de interpretar.

Por lo tanto, hay pocos datos farmacodinámicos de los recién nacidos en la actualidad, lo cual plantea un reto para el futuro (Skinner, 2014).

## 2. MARCO REGULATORIO EN MATERIA DE MEDICAMENTOS PEDIÁTRICOS

El uso de medicamentos no autorizados para los recién nacidos en cuidados intensivos es muy común y generalizado. Hasta un 93% de los bebés reciben al menos un medicamento no autorizado para este grupo de edad durante su estancia en cuidados intensivos. Esta práctica es una parte esencial de su cuidado y se debe hacer sobre la base de la mejor evidencia disponible. Sin embargo, los problemas surgen debido a la falta de información adecuada y formulaciones autorizadas para los recién nacidos. Estos problemas incluyen la selección del principio activo adecuado, la dosis, la vía de administración y el incremento del riesgo de errores de medicación (Conroy y McIntyre, 2005). En términos económicos, el grupo de edad pediátrica es un mercado muy pequeño para la mayoría de los fármacos (Skinner, 2014) lo cual hace que el desarrollo de medicamentos pediátricos sea poco rentable para la mayoría de las compañías farmacéuticas. Para hacer frente a este problema, se han introducido cambios legislativos (Skinner, 2014) en Estados Unidos y en Europa.

### 2.1. Estados Unidos

Las primeras medidas regulatorias fueron tomadas en Estados Unidos por la *Food and Drug Administration* (FDA), que desarrolló una serie de iniciativas que apuntaban a estimular la recolección de evidencias farmacológicas en pediatría. Esta legislación incluía la “*FDA Paediatric Rule*” en 1997 y la “*Paediatric Studies Incentive*” en 1998 (Stoyanova-Veninska y cols., 2011).

Posteriormente, el Congreso aprobó dos leyes que aumentaron el estudio de los fármacos en los niños: “*The Best Pharmaceuticals for Children Act (BPCA)*” que ofrece un incentivo para que las compañías farmacéuticas lleven a cabo estudios pediátricos solicitados por la FDA mediante la concesión de un período adicional de seis meses de exclusividad de mercado, y la “*Pediatric Research Equity Act (PREA)*” que requiere que las compañías farmacéuticas estudien sus productos en niños en ciertas circunstancias. Cuando se requieren estudios pediátricos, deben llevarse a cabo con el mismo fármaco y para el mismo uso para el que fueron aprobados en los adultos.

Antes de que la BPCA y la PREA se convirtieran en leyes, más del 80% de los medicamentos aprobados para el uso en adultos se estaba utilizando en los niños, a pesar de que la seguridad y eficacia no habían sido establecidas en ellos. Hoy en día ese número se ha reducido a alrededor de 50%.

Según la PREA, la FDA puede dispensar la realización de los estudios en niños si estos no son necesarios. Por ejemplo, si la enfermedad para la que se utiliza el fármaco en adultos no existe en niños, tales como el cáncer de próstata. En algunos casos, la FDA ha permitido que las compañías aplacen los estudios pediátricos, dependiendo de las circunstancias. Sin embargo, los plazos para los estudios aplazados a menudo se han perdido.

La FDA tiene herramientas para desalentar a las empresas del incumplimiento de los plazos para los estudios pediátricos aplazados. Cuando el Congreso reautorizó la PREA en el año 2012 como parte de la Ley “*Food and Drug Administration Safety and Innovation Act (FDASIA)*”, otorgó a la FDA nuevas potestades, de modo que la FDA puede conceder extensiones de los estudios pediátricos aplazados a petición de un patrocinador si hay una buena razón para un retraso en la realización de los estudios. Por ejemplo, si el patrocinador ha intentado diligentemente reclutar a los pacientes pediátricos, pero está teniendo dificultades para reclutar a un número suficiente para completar el estudio, la FDA puede conceder una prórroga del aplazamiento. Sin embargo, si un patrocinador no ha solicitado una extensión del aplazamiento, no ha podido presentar los estudios pediátricos antes de la fecha de vencimiento final acordado con la FDA o no ha solicitado la aprobación de una formulación pediátrica requerida, la FDA puede emitir una carta de no conformidad y publicarla en la web (Yao, 2013; One Hundred Twelfth Congress of the United States of America, 2012).

## **2.2.Unión Europea**

El pasado 26 de Enero de 2007 entró en vigor un Reglamento Pediátrico en la Unión Europea, cuyo objetivo es mejorar la salud de los niños en Europa mediante (EMA, 2006):

- Facilitar el desarrollo y la disponibilidad de medicamentos para los niños de 0 a 17 años,

- Asegurar que los medicamentos para uso en niños son objeto de investigaciones éticas, de alta calidad y debidamente autorizadas,
- Mejorar la disponibilidad de información sobre el uso de medicamentos para los niños.

Todo ello sin someter a la población pediátrica a estudios innecesarios, o retrasar la autorización de medicamentos para uso en adultos.

El Reglamento Pediátrico cambia radicalmente el entorno regulatorio de los medicamentos pediátricos en Europa y es de aplicación tanto para los medicamentos nuevos como para los ya autorizados que posean alguna indicación para este grupo de edad.

Este Reglamento establece la obligación a las compañías farmacéuticas de presentar un Plan de Investigación Pediátrica (PIP) (Artículos 7 y 8), como parte del programa de desarrollo destinado a garantizar que los datos necesarios se obtienen a través de estudios en niños, cuando es seguro hacerlo, para obtener la autorización de una indicación pediátrica (con una formulación adecuada a la edad) o una justificación para la no realización de estos estudios clínicos. El plan debe ser presentado por las compañías farmacéuticas en una fase muy temprana del proceso de desarrollo (siguiendo la Fase I en adultos) y está evaluado por el Comité Pediátrico de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), el cual se encarga de aceptar o rechazar el plan, y también puede otorgar exenciones o aplazamientos de esos estudios pediátricos (Stoyaniva-Beniska y cols., 2010; EMA, 2006 y European Commission, 2008).

El plan debe cubrir las necesidades de todos los grupos de edad de los niños, desde el nacimiento hasta la adolescencia y, entre otros aspectos, ha de incluir la estrategia en relación a los aspectos no clínicos, teniendo en cuenta la farmacología, la farmacocinética y la toxicología.

El plan también define el tiempo de estudios en niños en relación con los estudios en adultos. En algunos casos, los estudios se aplazarán hasta que los estudios en adultos hayan finalizado. De esta forma, la investigación con niños se lleva a cabo sólo cuando su realización sea segura y ética. Aun cuando los estudios se han aplazado, el PIP debe incluir detalles sobre los estudios y los tiempos previstos.



Las decisiones relacionadas con el diseño del estudio y los tiempos, tal y como se especifica en el PIP y acordado con el Comité Pediátrico son vinculantes para las compañías farmacéuticas. Según esta regulación, se conceden seis meses adicionales de exclusividad de mercado cuando los requerimientos del PIP están adecuadamente ejecutados y se incluye en la ficha técnica la evidencia de estos estudios (incluso si los resultados son negativos). Para medicamentos huérfanos la exclusividad de mercado se extiende de 10 a 12 años, condicionados al cumplimiento del PIP.

En el caso de los medicamentos que no tienen exclusividad de mercado, las compañías pueden decidir desarrollar una dosis, forma farmacéutica o ruta de administración adecuadas para uso pediátrico. Estudios pediátricos con datos que soportan lo anteriormente mencionado pueden ser presentados mediante la Autorización de Comercialización de Uso Pediátrico (PUMA) (Artículo 30). El PUMA resulta en 10 años de protección de datos como incentivo (Stoyaniva-Beniska y cols., 2010).

### 3. PATOLOGÍAS FRECUENTES EN PEDIATRÍA

#### 3.1. Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPN)

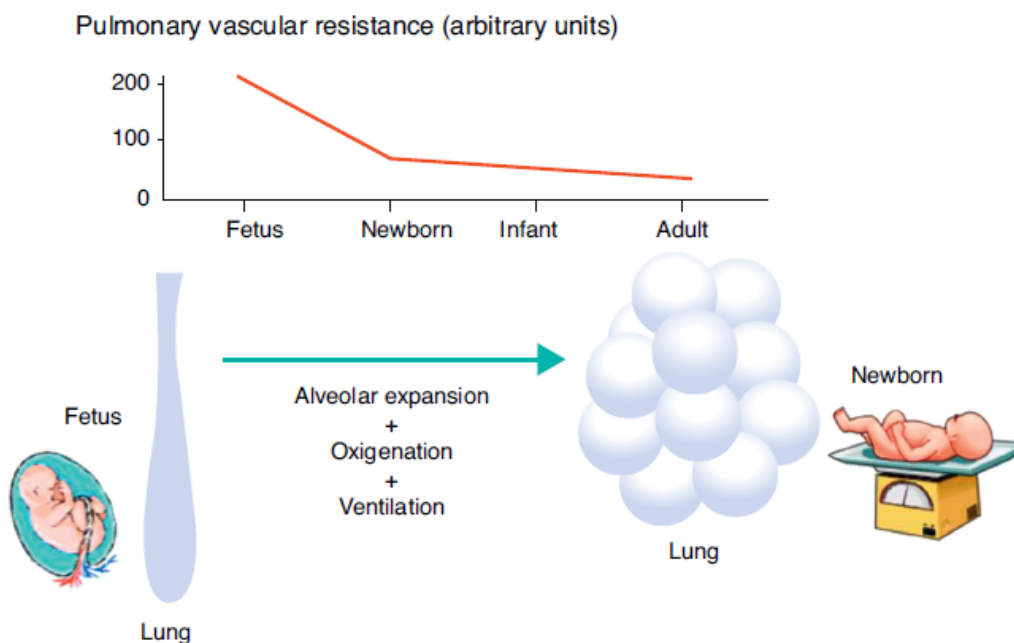
##### 3.1.1. Descripción/Sintomatología

La HPPN ocurre cuando la resistencia vascular pulmonar (RVP) permanece alta después del nacimiento dando como resultado un *shunt* de derecha a izquierda a través de las vías fetales de circulación (Cabral y Belik, 2013). Ello conduce a una profunda hipoxemia que no responde al soporte respiratorio convencional (Stayer y Liu, 2010; Steinhorn y cols., 2009). Si esto no se interrumpe, se puede desarrollar un ciclo vasoconstrictor pulmonar vicioso, aumentando aún más la resistencia vascular pulmonar y disminuyendo la perfusión pulmonar que resulta en hipoxemia refractaria y en acidosis. La prevención de este ciclo, o su interrupción si ya está presente, es esencial en la reducción de daño de órgano hipóxico-isquémico y la mortalidad (Engelbrecht, 2008). Contrariamente a la hipertensión pulmonar primaria en adultos, el síndrome del recién nacido no se define por una presión específica de la circulación pulmonar (Cabral y Belik, 2013).

La circulación pulmonar fetal se caracteriza por una RVP elevada y la presencia de una derivación (*shunting*) de derecha a izquierda a través del conducto arterioso y foramen oval. Estos canales permiten que el flujo de sangre llegue a la aorta desde la aurícula derecha, ya que sólo el 10% del gasto cardíaco del ventrículo derecho llega a los pulmones, como resultado de la alta RVP fetal (Cassin y cols., 1975; Leffler y cols., 1984).

Hay varios mecanismos que contribuyen al mantenimiento de una RVP alta en el periodo fetal. Los principales mecanismos incluyen: presión de oxígeno baja ( $PO_2$ ), disminución de la producción de vasodilatadores (por ejemplo prostaglandinas con efecto vasodilatador [prostaciclina]), y aumento de la producción de vasoconstrictores, tales como las endotelinas. Por lo tanto, la circulación pulmonar fetal se caracteriza por la capacidad de oponerse a la vasodilatación para regular su flujo (Cabral y Belik, 2013; Storme y cols, 2013). Al nacer, el flujo de sangre en los pulmones aumenta de forma espectacular, de 8 a 10 veces y la RVP cae inmediatamente (Figura 2). Varios estímulos, incluyendo el drenaje y la absorción del líquido pulmonar fetal, la distensión

rítmica del pulmón, el aumento de la  $PO_2$  y la producción de varios agentes vasoactivos, incluyendo el óxido nítrico (ON), contribuyen a la vasodilatación pulmonar al nacer (Storme y cols., 2013). Cualquier condición que interfiera con este proceso causa una persistencia de la circulación transicional con la consiguiente hipertensión pulmonar persistente del recién nacido.



**Figura 2.** Resistencia vascular pulmonar durante la transición de la vida fetal a la neonatal (Cabral y Belik, 2013).

El diagnóstico de la HPPN se confirma independientemente de la presión arterial, siempre que esté acompañado por una derivación (*shunt*) de derecha a izquierda y la ausencia de anomalías cardíacas congénitas. Este concepto es muy importante pues no sólo el incremento de la resistencia vascular sino también la capacidad del ventrículo derecho para sobreponerse a esa resistencia, son factores determinantes en la hipertensión pulmonar neonatal (Cabral y Belik, 2013).

### 3.1.2. Causas/Etiología

La interrupción en la transición circulatoria fetal-neonatal perinatal normal que resulta en HPPN puede ser debida al subdesarrollo vascular pulmonar intrauterino (disminución del crecimiento vascular), trastornos del desarrollo (estructura vascular anormal) y/o a una mala adaptación (hipoxia perinatal inducida por vasoespasmo

pulmonar). La asfixia intrauterina o perinatal y el síndrome de aspiración del meconio siguen siendo las causas asociadas más comunes (Engelbrecht, 2008).

### 3.1.3. Incidencia

La hipertensión pulmonar persistente del recién nacido ocurre primariamente en neonatos nacidos a término o con una edad gestacional superior a 34 semanas (Engelbrecht, 2008) y la prevalencia se ha estimado en 1.9 por 1000 de los recién nacidos vivos (Cabral y Belik, 2013; Stayer y Liu, 2010).

### 3.1.4. Tratamiento.

En virtud de sus efectos selectivos como vasodilatador pulmonar, el óxido nítrico inhalado (ONi) se considera el tratamiento de elección en la hipertensión pulmonar en neonatos nacidos a término o prematuros (Barrington y Finer, 2001). Aproximadamente el 30% de los neonatos con HPPN no responden al ONi (Goldman y cols., 1996). En algunos pacientes, la terapia con óxido nítrico se asocia con hipertensión pulmonar de rebote cuando la terapia se interrumpe debido a la supresión del ácido nítrico endógeno y a la producción de óxido (Kinsella y Abman, 2000). Otras complicaciones potenciales pueden incluir el desarrollo de metahemoglobinemia. Además, el ONi es una intervención costosa (Subhedar y cols., 2002).

El sildenafil citrato (SLD) es un potente inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) utilizado frecuentemente en la disfunción eréctil (Sivakranth y cols., 2011) (Viagra®).

La fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) es la isoforma predominante de fosfodiesterasa en el pulmón que metaboliza el guanosín monofosfato (GMP) cíclico (Steinhorn y cols., 2009). La inhibición de la PDE5 conduce al aumento de la concentración del adenosin monofosfato (AMP) cíclico y GMP a nivel local, que a su vez conduce a la relajación de los músculos lisos vasculares pulmonares (Shah y Ohlsson, 2011). De hecho, recientemente también se ha autorizado para el tratamiento de la hipertensión pulmonar en adultos (Revatio®) (EPAR Revatio, 2012).

Por otro lado, la bibliografía consultada muestra que en siete recién nacidos con hernia diafragmática congénita (HDC), el sildenafil mejoró el gasto cardíaco y la función respiratoria mediante la reducción de la hipertensión pulmonar refractaria a ONi (Noori y cols., 2007). En este sentido, también se ha encontrado que en pacientes con hipertensión pulmonar crónica asociada a HDC, el sildenafil mejoró la función vascular pulmonar y promovió el crecimiento de pulmón (Keller y cols., 2006).

Existen pruebas de que el sildenafil es bien tolerado en neonatos con HPPN (Steinhorn y cols., 2009).

Un meta-análisis de tres ensayos que incluyeron 77 recién nacidos con HPPN ha indicado que el sildenafil puede mejorar la oxigenación y reducir la mortalidad (Shah y Ohlsson, 2011). Los estudios se realizaron en entornos con recursos limitados donde el ONi no estaba disponible. Los resultados del meta-análisis sugieren que el sildenafil en el tratamiento de la HPPN tiene un importante potencial, especialmente en entornos con recursos limitados (Storme y cols., 2013).

Otros estudios informan de su eficacia en forma de preparaciones orales en los recién nacidos con HPPN. También hay casos publicados de administración intravenosa e intratraqueal o administración nebulizada en los seres humanos y modelos animales con hipertensión pulmonar persistente (Engerlbrecht, 2008).

El perfil farmacocinético del sildenafil oral no se ha evaluado formalmente en los niños. En los adultos se absorbe rápidamente después de la administración, con una biodisponibilidad de aproximadamente 40%. Las concentraciones séricas máximas se producen a las 0,5-2 horas después de una dosis oral. El sildenafil se une fuertemente a proteínas (96%) y se distribuye ampliamente a todo el cuerpo. Se metaboliza a través de la vía hepática por el sistema enzimático del citocromo P450, tiene una vida media de eliminación de aproximadamente 4 horas en los adultos, y se excreta en las heces (80%) y la orina (13%) (Buck, 2004).

El intervalo de dosis utilizado es generalmente de 0,5-2 mg/kg/dosis a intervalos de 6 horas con ajuste de la dosis basado en la respuesta (Engelbrecht, 2008; Sola y Baquero, 2007).

### **3.2. Insuficiencia cardíaca congestiva**

#### **3.2.1. Descripción- sintomatología**

La insuficiencia cardíaca (IC) o insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) es la incapacidad del corazón para llevar oxígeno a los tejidos a un ritmo acorde con las demandas metabólicas. En términos generales, se puede dividir en insuficiencia sistólica y diastólica, aunque las dos están estrechamente relacionadas y a menudo se producen juntas en el mismo paciente, especialmente en insuficiencia avanzada donde los mecanismos de adaptación comienzan a fallar (Simmonds y cols., 2006).

La IC pediátrica es una enfermedad relativamente poco común, por lo que la mayoría de los profesionales de atención primaria o los servicios de urgencias tienen poca experiencia práctica con su presentación en los niños. Las manifestaciones clínicas pueden ser muy diferentes a las de los adultos, y bastante variables. Debido a que el 87% de los casos de nueva aparición de IC, sólo tiene un diagnóstico cuando el paciente está en un estado de descompensación severa (Andrews y cols., 2008), y menos de 50% de los niños que presentan IC sintomática sobreviven por 5 años sin un trasplante cardíaco (Towbin y cols., 2006; Kantor y cols., 2010), el diagnóstico precoz y el tratamiento eficaz se presentan como importantes desafíos que deben ser abordados.

En los bebés, los síntomas de la insuficiencia cardíaca más comúnmente exhibidos incluyen taquipnea, taquicardia, falta de apetito y retraso en el desarrollo (Ross y cols., 1992). Otros signos de la insuficiencia cardíaca en este grupo de pacientes incluyen hepatomegalia, galope diastólico en el examen físico, y agrandamiento cardíaco, con o sin edema pulmonar en la radiografía de tórax. Los niños pequeños y niños mayores también pueden presentar taquicardia y taquipnea pero los síntomas que se manifiestan generalmente son fatiga e intolerancia al ejercicio; la falta de apetito y la falta de crecimiento también son típicas en este grupo de edad. En los niños mayores, se puede evidenciar además una distensión venosa y un edema periférico. Los adolescentes tienen síntomas similares a los adultos, incluyendo dificultad para respirar, fatiga, intolerancia al ejercicio, ortopnea, disnea nocturna, y síntomas gastrointestinales (Kay y cols., 2001).

### 3.2.2. Causas/Etiología

Las principales causas de la ICC en niños que viven en países desarrollados son (Kay y cols., 2001):

- Defectos congénitos del corazón que producen una carga de trabajo excesiva en el miocardio como resultado de la presión o sobrecarga de volumen con o sin cianosis crónica. En los países desarrollados los defectos estructurales del corazón son la causa más común de insuficiencia cardíaca en los bebés y los niños.

Los defectos que más probablemente pueden causar insuficiencia cardíaca incluyen lesiones en la derivación de izquierda a derecha (por ejemplo, el defecto septal interventricular, defecto común del canal atrioventricular, conducto arterioso persistente, ventana aortopulmonar, tronco arterioso), lesiones obstructivas del corazón (por ejemplo, estenosis aórtica crítica, coartación aórtica severa, estenosis mitral congénita) y regurgitación congénita atrioventricular o de la válvula semilunar.

- La disfunción miocárdica después de la reparación o la paliación de los defectos cardíacos.
- Cardiomiopatías, tanto genéticamente determinadas como adquiridas, que resultan de un trastorno metabólico y muscular hereditario, enfermedades infecciosas, drogas y toxinas, y la enfermedad de Kawasaki.

### 3.2.3. Incidencia

La incidencia de las cardiopatías congénitas es relativamente alta, produciéndose en el 0,8% de los nacidos vivos. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de estos defectos son lo suficientemente graves como para resultar en insuficiencia cardíaca durante la infancia. Además, ciertos procesos sistémicos tales como enfermedades inflamatorias, trastornos metabólicos, trastornos endocrinos, y el resultado de una enfermedad renal resultan en un número desconocido de casos (Kantor y cols., 2013). La incidencia anual de la insuficiencia cardíaca asociada a defectos congénitos es de aproximadamente 0,1% a 0,2% de los nacimientos vivos (Kay y cols., 2001).

Datos recientes indican que en Estados Unidos, de 10.000 a 14.000 niños son hospitalizados todos los años con insuficiencia cardíaca como uno de sus diagnósticos, y de ellos aproximadamente el 27% (aproximadamente 3000) han presentado anomalías del músculo del corazón (incluyendo ritmo irregular del corazón) como una causa subyacente (Rossano y cols., 2012).

#### 3.2.4. Tratamiento

Aparte de la cirugía (en la enfermedad cardíaca congénita), el principal enfoque para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca pediátrica es el tratamiento farmacológico. Los fármacos que se utilizan en el tratamiento de la ICC son la digoxina; los inhibidores del sistema angiotensina, los B-bloqueantes y los diuréticos.

Los diuréticos han sido utilizados en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en adultos y niños, por razones obvias. Están indicados en pacientes que presentan síntomas o signos de ICC, tales como disnea, y producen un beneficio sintomatológico más rápidamente que cualquier otro fármaco para la insuficiencia cardíaca. La reducción de la precarga no sólo disminuye la congestión pulmonar, sino que también conduce a una reducción del estrés en la pared del miocardio, lo que es un potente estímulo para la remodelación. Los diuréticos de asa también pueden causar vasodilatación pulmonar, con alivio sintomático. Sin embargo, poseen el efecto secundario de la activación neurohormonal por lo que pueden estar relativamente contraindicados en pacientes sin síntomas de la congestión (Simmonds y cols., 2006).

La espironolactona es un antagonista competitivo de la aldosterona que actúa a nivel del túbulo renal distal para aumentar la excreción de sodio y agua, y reducir la eliminación de potasio (Salgado y cols., 2005). El uso de espironolactona en lactantes y niños fue reportado por primera vez en 1964, donde la administración del fármaco a tres niños produjo una diuresis moderada (Walker y Cumming, 1964). Desde entonces, la espironolactona ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva asociada con la enfermedad cardíaca congénita (Noerr, 1999; Hobbins y cols., 1981; Buck, 2005). El estudio clínico RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) mostró una reducida mortalidad y hospitalización en adultos con ICC severa cuando se trataron con dosis bajas de espironolactona. Un pequeño estudio



randomizado en niños demostró la seguridad y la eficacia diurética en este grupo de población (Kay y cols., 2001).

La dosis recomendada en pediatría es de 3.0 mg/kg divididos en varias dosis (Asiri y cols., 2001).

La furosemida es un derivado del ácido antranílico (Smith, 1980) comúnmente utilizado como diurético de asa (Foye y cols., 1995) mostrando un rápido inicio y una alta eficacia (Brazzy y Gunn, 1976). Actúa sobre el tramo grueso ascendente del asa de Henle (Giebisch, 1985) inhibiendo el cotransporte de sodio, potasio y cloruro, y causando la excreción de calcio, magnesio e iones de bicarbonato (Brazzy t Gunn, 1976; Toral y cols., 2002). Es ampliamente utilizada para el tratamiento de trastornos cardíacos y pulmonares en bebés prematuros y recién nacidos. La dosis diaria varía entre 1mg/kg hasta un máximo de 40 mg, su vida media es de 2 horas y la biodisponibilidad oral se ha reportado en el 60-70% (Agyralides y cols., 2004).

### **3.3.Síndrome de abstinencia neonatal**

#### **3.3.1. Descripción**

En las últimas décadas existe un elevado número de mujeres que ingieren sustancias ilícitas (ej. opioides) en edad fértil. (EMCDDA, 1996). Estas mujeres, a menudo, experimentan amenorrea secundaria y están en riesgo de embarazos no planeados o no muestran una planificación familiar estructurada (Ebner y cols., 2006). De hecho en los últimos años se ha producido un incremento en las dosis de metadona prescritas a mujeres dependientes de opiáceos durante el embarazo (Wouldes y Woodward., 2013). A pesar de estas evidencias, con frecuencia se subestima el efecto del consumo de drogas durante el embarazo sobre la madre, sobre el feto y/o sobre el recién nacido (Ebner y cols., 2007).

La abstinencia de un fármaco o una droga se refiere a los signos y síntomas característicos que aparecen cuando se interrumpe repentinamente la ingesta de una droga que causa dependencia física. La abstinencia neonatal, más comúnmente conocida como Síndrome de Abstinencia Neonatal (SAN) puede ocurrir debido al uso de este tipo de sustancias por parte de la madre durante el embarazo (D'Apollito, 2009).

La clínica del SAN depende de varios factores, incluyendo si el embarazo ha llegado a término, el momento del último consumo de drogas de la madre, la droga (o drogas) a la que estuvo expuesto el neonato, la cantidad de droga que la madre tomaba, y las tasas de metabolismo y eliminación de la madre y el recién nacido. Los recién nacidos prematuros (con menos de 35 semanas de gestación) pueden tener un riesgo menor ante la retirada del fármaco que los recién nacidos a término (Doberczak y cols., 1991).

El SAN se caracteriza por temblores, agitación, hipertonia, llanto anormal, bostezos, estornudos, taquipnea, vómitos, diarrea, fiebre, succión deficiente y en casos muy raros convulsiones (Finnegan, 1995).

### 3.3.2. Incidencia

Se estima que entre el 50% y el 90% de los niños expuestos a opiáceos *in utero* desarrollarán signos y síntomas del SAN (D'Apolito, 2009) y que entre el 30% y el 80% de los recién nacidos expuestos a los opiáceos en el útero va a necesitar tratamiento para el SAN (Wouldes y Woodward., 2013; Johnson y cols., 2003).

### 3.3.3. Tratamiento

El SAN se evalúa con frecuencia usando la escala semi-objetiva de Finnegan, un sistema estandarizado que asigna una puntuación ponderada a 21 signos de SAN (Ebner y cols., 2007). La puntuación numérica ponderada se utiliza en conjunción con las directrices de tratamiento de apoyo o farmacológicas para controlar la respuesta clínica del niño, y proporcionar una manera amplia y objetiva de evaluar el inicio, la progresión y la disminución de los síntomas de la abstinencia (10). Una puntuación de Finnegan mayor o igual 8 indica signos de abstinencia y es la puntuación mínima en la que se pone en marcha el tratamiento (Finnegan y cols., 1975). La herramienta de Lipsitz también se utiliza para medir la gravedad de la abstinencia. Esta escala utiliza un sistema numérico simple donde un valor mayor de 4 indica signos de abstinencia significativa (Lipsitz, 1975).

La decisión de utilizar una terapia con medicamentos debe ser individualizada sobre la base de la gravedad de los signos de la abstinencia y la evaluación de los riesgos y beneficios del tratamiento. Encuestas recientes han documentado que el 94% de los

médicos del Reino Unido y el 83% de los médicos de EE.UU utilizan un opiáceo (morfina o metadona) como fármaco de primera elección (Hudak y cols., 2012). La mayoría de los profesionales utilizan el fenobarbital como segunda droga si el opiáceo no controla adecuadamente los signos de abstinencia (O'Grady y cols., 2009; Sarkar y Donn, 2006).

La dosis inicial de metadona que se utiliza en el tratamiento del SAN es 0,05-0,1 mg / kg cada 6 h, con incrementos de 0,05 mg hasta que los síntomas son controlados. Una vez controlados los síntomas, la metadona se administra cada 12-24h. La retirada de la droga debe ser con una disminución progresiva diaria del 10-20% de la dosis. Una vez que se alcanza la dosis de 0,05 mg, el tratamiento podría concluir (Doberczak y cols., 1991; Bio y cols., 2011).

En el caso del fenobarbital, la dosis inicial es de 16 mg/kg/día dividida en dosis cada 8-12 horas; la dosis se incrementa en intervalos de 0.05 mg/kg hasta que los signos están controlados. Cuando los signos están controlados, se administra una dosis cada 12-24 horas. El tratamiento se puede discontinuar una vez que se alcanza la dosis de 0.05 mg/kg/día. (Doberczak y cols., 1991; Bio y cols., 2011).

### **3.4.Convulsiones/Epilepsia**

#### **3.4.1. Descripción e incidencia**

Hay dos síndromes epilépticos parciales benignos comunes durante la infancia: la epilepsia parcial benigna de la infancia (EPBI) y las convulsiones familiares benignas neonatales (CFBN).

De acuerdo con la Liga Internacional contra la Epilepsia, las CFBN son un claro síndrome epiléptico cuya naturaleza benigna y ocurrencia familiar fue reportada por primera vez en la literatura inglesa por Bjerre y Corelius (Bjerre y Corelius, 1968; Fister y cols., 2013) Se trata de un síndrome genéticamente heterogéneo, caracterizado por convulsiones parciales o generalizadas que ocurren alrededor del tercer día de vida y remiten espontáneamente en semanas o meses. El examen neurológico y físico en el recién nacido con CFBN es normal y también lo son las pruebas de laboratorio y exámenes de neuro-imagen. Aproximadamente el 50-70% de los bebés que padecen

CFBN tienen un electroencefalograma (EEG) interictal normal, y sobre el 25% muestran un patrón '*theta pointu alternante*'. El EEG suele ser normal a los 24 meses (Plouin y Anderson; 2005) y el desarrollo psicomotor en niños con CFBN suele ser también normal (Fister y cols., 2013). Se ha reportado que el 10-15% de los individuos con CFBN desarrollan convulsiones epilépticas durante la vida (Steinlein y cols., 2007). El diagnóstico de CFBN se basa en los hallazgos clínicos y pruebas de genética molecular de los dos genes que se sabe que están asociados con CFBN (Fister y cols., 2013). Su prevalencia se ha estimado en 0.5-1% de los niños (Yilmaz y cols., 2014).

#### 3.4.2. Tratamiento

El fenobarbital es un barbitúrico utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de epilepsia pediátrica (Djabri y cols., 2012) y está en la primera línea de elección para controlar las convulsiones neonatales (Lehr y cols, 2005; Blume y cols., 2009).

#### 4. PAPEL DE LA FORMULACIÓN MAGISTRAL EN PEDIATRÍA

Hasta la fecha, la vía oral es la más usada para la administración de medicamentos, sin embargo las formas de dosificación, en su mayoría sólidas, limitan el tratamiento de grupos especiales de población como, pacientes geriátricos, pediátricos y disfágicos, los cuales presentan dificultad para tragar o masticar (Rubia y cols., 2012).

En la actualidad existe un interés creciente por mejorar la terapia farmacológica, no sólo aportando nuevos fármacos, sino garantizando que el uso de los ya existentes sea más eficaz. Precisamente el objetivo de la administración de un fármaco o medicamento es la obtención de un efecto terapéutico sobre el paciente. Para que pueda ejercer este efecto el fármaco debe alcanzar concentraciones adecuadas en la “biofase” o lugar de acción. Para ello y previo a su comercialización, el uso clínico ideal de un fármaco debe basarse en los datos de eficacia y seguridad de cada principio activo en particular, siendo necesario precisar sus posibilidades de uso en función de cada indicación. Además, hay que tener en cuenta sus características cinéticas, para poder definir sus pautas de utilización y posología en cada uso concreto y por otro lado se deben considerar otros factores como facilidad en la vía de administración y coste. Frente a todas estas premisas, la edad y los cambios que se experimentan fisiológicamente con el crecimiento son indudablemente una fuente de variabilidad farmacocinética y probablemente farmacodinámica, que se relacionan con las diferencias entre la edad pediátrica y la adulta. Así pues, se ha de considerar, que la administración de fármacos a niños y en especial a neonatos es mucho más compleja que en adultos. No obstante, en ciertas ocasiones se realiza una extrapolación de las dosis del adulto, utilizándose un ajuste en relación con el peso corporal, o más raramente con la superficie corporal. Esta aproximación puede derivar en el uso de dosis tóxicas o ineficaces consecuencia de la variabilidad de los ya comentados procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los fármacos en niños.

La principal causa de esta actuación se debe a la ausencia de una adecuada forma farmacéutica que garantice la correcta dosificación y administración así como el correcto cumplimiento terapéutico.

A pesar de los avances regulatorios en pediatría, la mayoría de los principios activos se comercializan sólo como formas farmacéuticas sólidas (cápsulas y/o comprimidos) o en dosis más altas de las necesarias para la población pediátrica. Algunos de estos medicamentos se han citado anteriormente (sildenafil, espironolactona, furosemida, metadona, fenobarbital, etc).

Este es un problema constante para la población pediátrica o incluso para otros grupos de población que no pueden deglutir las formas de dosificación sólidas, deben recibir medicamentos a través de sonda nasogástrica o la gastronomía, y/o requieren dosis no estándar que se administran más fácilmente y con mayor precisión mediante una formulación líquida (Glass y Haywood, 2006).

En la actualidad, se están estudiando otras formas novedosas de dosificación, tales como mini-comprimidos, (Thomson y cols., 2009) o comprimidos de disolución rápida, pero existe un temor de asfixia con estos últimos debido a que su apariencia es muy similar a la de los comprimidos tradicionales (Rubia y cols., 2012).

Las formas farmacéuticas líquidas administradas por vía oral se consideran la mejor opción para esta población. Estas se preparan fácilmente y permiten la flexibilidad de dosificación (Viriyaroj y cols., 2009) de modo que una única preparación líquida puede ser utilizada para los lactantes y los niños de todas las edades, donde la dosis del fármaco varía según el volumen administrado (Allen, 2008).

La formulación magistral, se presenta pues, como la principal estrategia, para la elaboración de formas farmacéuticas que garanticen la correcta administración, dosificación y cumplimiento terapéutico de cualquier enfermedad.

Una fórmula magistral es por definición un “medicamento destinado a un paciente individualizado, preparado por el farmacéutico, o bajo su dirección, para cumplimentar expresamente una prescripción facultativa detallada de las sustancias medicinales que incluye, según las normas técnicas y científicas del arte farmacéutico, dispensado en su farmacia o servicio farmacéutico y con la debida información al usuario” (Real Decreto 175/2001).

Hasta que la revolución industrial alcanzó al mundo de la sanidad las fórmulas magistrales fueron los únicos medicamentos disponibles. Su elaboración constituía la principal labor de los farmacéuticos y su diseño la mejor muestra de colaboración entre éstos y los médicos en pos del beneficio de los pacientes. Sin embargo, el desarrollo de las especialidades farmacéuticas supuso un continuo declive de estos medicamentos y actualmente un buen número de profesionales sanitarios las consideran una reliquia del pasado. Ahora bien, la formulación magistral sigue teniendo un lugar en la terapéutica del siglo XXI en un entorno de medicina basada en las pruebas y uso racional de los medicamentos.

Ese lugar está en aquellos casos en los que se requiere:

1. Utilizar un principio activo que no está disponible como especialidad farmacéutica, generalmente por falta de rentabilidad para un eventual laboratorio fabricante, aunque también en otras ocasiones por problemas de estabilidad fisicoquímica.
2. Ajustar la dosis, forma farmacéutica o vía de administración a las necesidades de un determinado paciente.
3. Sustituir una especialidad farmacéutica porque uno de los excipientes no es bien tolerado por el paciente.

Con el uso de las fórmulas magistrales podemos por tanto cubrir vacíos terapéuticos, facilitar la individualización de los tratamientos y permitir la administración de preparados poco estables gracias a la preparación extemporánea.

Ahora bien, para ser realmente útiles, las fórmulas magistrales deben cumplir los mismos requisitos de calidad que cualquier otro medicamento. Para ello es imprescindible que se elaboren conforme a las Normas de Correcta Fabricación y Control de calidad que establece la normativa legal vigente (Real Decreto 175/2001).

Las FM son el grupo de medicamentos sobre los que existe una menor regulación. Prácticamente las únicas limitaciones legales son que:

- Una práctica común es la preparación de las formas de dosificación líquidas a partir de una dosis oral sólida disponible en el mercado simplemente triturando los comprimidos o abriendo una capsula (Glass y Haywood, 2006). Sin embargo, el uso de la sustancia activa (API) mediante la modificación de un comprimido o cápsula comercialmente disponible podría tener implicaciones clínicas y legales (James, 2005).
- Sólo puede utilizarse sustancias de acción e indicación reconocidas legalmente.
- No pueden utilizarse órganos o glándulas de origen animal.
- No pueden asociarse en una misma fórmula anorexígenos, psicótropos, hormonas, laxantes y diuréticos entre sí o con otros medicamentos (excepcionalmente se podrán asociar dos de estas sustancias acompañando la prescripción de un informe haciendo constar la necesidad, eficacia y seguridad de esta asociación en el tratamiento peculiar que se implanta).

Esta situación, en principio favorable, implica que toda la responsabilidad sobre la prescripción y el uso racional de estos medicamentos queda depositada en los profesionales sanitarios implicados en su utilización. Por este motivo, a la hora de prescribir y dispensar fórmulas magistrales es especialmente importante ajustarse a unos criterios de uso racional.

Sin embargo, existe escasa información sobre la idoneidad y la estabilidad de las fórmulas magistrales (en su mayoría preparaciones líquidas orales) (Brion y cols., 2003) utilizadas como alternativa a las formas sólidas comercializadas. La variabilidad en el diseño de tales preparados, a veces con baja estabilidad o desconocida, conduce a la posibilidad de errores de medicación en el manejo de las dosis. Además, el control de dosificación o la estabilidad no se llevan a cabo en las farmacias u hospitales, ya que se determinan por métodos tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que requieren un esfuerzo económico o una inversión de tiempo considerable (Santoveña y cols., 2012).

En nuestro entorno, son pocos los estudios que han valorado la utilización de fórmulas magistrales para el uso en pediatría. Es decir que, el mayor inconveniente para difundir estos fármacos es la falta de investigación no sólo a nivel clínico, por motivos obvios, sino a nivel tecnológico.





## **CAPÍTULO II.**

### **OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO**

---



La falta de disponibilidad de presentaciones comerciales adecuadas para la posología pediátrica todavía supone un gran problema, especialmente relevante en medicamentos con margen terapéutico estrecho, ya que puede derivar en infra o sobredosificaciones; o en niños que sufren enfermedades crónicas, condenados a tomar medicamentos mal adaptados y sufrir las consecuencias que ello supone; o en las ocasiones en las que se presentan casos de intolerancias o alergias hacia determinados excipientes. Todo ello obliga a realizar un gran número de fórmulas magistrales.

Evidentemente, para solventar este problema, las formas farmacéuticas líquidas siguen siendo la mejor alternativa a las formas farmacéuticas sólidas, ya que ofrecen una serie de ventajas:

- Versatilidad para el ajuste de dosis, frecuentemente modificada en estos pacientes en función del peso o de la respuesta clínica.
- Facilidad de administración.
- Fiabilidad de la dosificación.
- Posibilidad de administración por sonda nasogástrica.

Sin embargo, la variabilidad en el diseño de fórmulas magistrales, la falta de uniformidad en el caso de las suspensiones y el inconveniente de la menor estabilidad de las formas líquidas, conlleva la posibilidad de errores de medicación en el manejo de las dosificaciones. De aquí que la terapéutica en pacientes pediátricos o pacientes con dificultades para deglutir, dependa en gran medida de la elaboración de formulaciones magistrales adecuadas.

A la vista de lo anterior, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, la caracterización y el estudio de estabilidad de fórmulas magistrales orales (soluciones o suspensiones) aptas para uso pediátrico, como alternativa a las formas orales sólidas ya comercializadas. En el desarrollo de las fórmulas también se ha tenido en cuenta la población diabética.

Los principios activos seleccionados para el presente estudio han sido:

- Sildenafil
- Espironolactona
- Furosemida
- Metadona
- Fenobarbital

Dicha elección se ha llevado a cabo en función de la importancia de estas sustancias en la prescripción pediátrica.

En base a todo lo anterior y para la consecución del objetivo planteado, el plan de trabajo fue:

- Recopilar información de los servicios de farmacia de los principales hospitales de referencia en España, sobre los principios activos y las formulaciones utilizadas.
- Actualizar el conocimiento sobre los principios activos seleccionados y su utilización en la población pediátrica.
- Establecer la fórmula cuali-cuantitativa de cada una de las formulaciones y poner a punto la técnica de elaboración de las mismas.
- Desarrollar y validar un método sensible y rápido como técnica analítica de referencia para la cuantificación del principio activo. De cada técnica analítica, se determina la linealidad, la precisión y la exactitud del método analítico. Asimismo se determinan los límites de cuantificación y detección para cada uno de los principios activos objeto de estudio.
- Realizar los controles físico-químicos y microbiológicos correspondientes con el objeto de caracterizar las diferentes fórmulas al inicio del estudio:
  1. Características organolépticas (aspecto, color, olor).
  2. Cuantificación del principio activo
  3. Determinación del pH

4. Comportamiento reológico y viscosidad
  5. Tamaño de partícula (sólo en el caso de las suspensiones)
  6. Estabilidad óptica acelerada (sólo en el caso de las suspensiones).
  7. Análisis microbiológico (Ph.Eur.)
- Determinar la estabilidad de las fórmulas magistrales caracterizadas. Para lo cual, se almacenan a tres temperaturas (4, 25 y 40 °C), protegidas de la luz, durante un periodo máximo de 90 días y se realiza el análisis de la evolución de determinados parámetros fisicoquímicos medidos a diferentes tiempos pre-establecidos a lo largo de los 90 días.
  - Realizar controles biofarmacéuticos con el objeto de determinar la influencia de los excipientes en los procesos de liberación y absorción del principio activo:
    1. Liberación: estudios *in vitro* (ensayos de disolución).
    2. Absorción: Estudios *ex vivo* (estudio de la absorción a través de intestino delgado de cerdo).

Con el fin de conocer la existencia de diferencias estadísticamente significativas, los valores obtenidos para cada uno de los ensayos descritos anteriormente fueron analizados con Prism®, V. 3 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Dependiendo de la distribución de estos datos se aplicó un test apropiado.



# **CAPÍTULO III.**

## **RESULTADOS**

---





## RELACIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- **Provenza N.**, Calpena A.C., Mallandrich M., Halbaut L., and Clares B. 2014. "Design and physicochemical stability studies of paediatric oral formulations of sildenafil". *International Journal of Pharmaceutics*. 460 (1-2): 234-239.
- **Provenza Bernal N.**, Calpena A.C., Mallandrich M., Ruiz A., and Clares B. 2014. "Development, physical-chemical stability, and release studies of four alcohol-free spironolactone suspensions for use in pediatrics". *Dissolution Technologies*. 21 (1): 19-30.
- **Provenza N.**, Calpena A.C., Egea A., Mallandrich M., García, M.L., Alvalrado, H.L., Clares B. 2012. "Development of a spectrofluorometric method for the determination of furosemide in oral solutions for paediatric use. XV International Symposium on Luminescence Spectrometry - Biophysical and Analytical Aspects, Extended Abstracts, 19-22 June 2012, Barcelona, Spain - (ISLS 2012)". *Luminescence*. 27 (6): 553.
- **Provenza, N.**, A.C. Calpena, M. Mallandrich, A. Sánchez, M.A. Egea, and B. Clares. 2014. "Permeation studies through porcine small intestine of furosemide solutions for personalised paediatric administration". *International Journal of Pharmaceutics*. 475: 208-213.
- **Provenza N.**, Calpena A.C., Mallandrich M., Halbaut L., Pueyo B., Clares B. "Development and stability study of solutions containing methadone or phenobarbital for the treatment of Neonatal Abstinence Syndrome". Sometido.



## **1. DESIGN AND PHYSICOCHEMICAL STABILITY STUDIES OF PAEDIATRIC ORAL FORMULATIONS OF SILDENAFIL.**

La Hipertensión Pulmonar Persistente del recién nacido (HPPN) ocurre en el 1.9 por 1000 de los recién nacidos vivos. El sildenafil, utilizado frecuentemente en la disfunción eréctil, es un potente inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) que es la isoforma predominante en el pulmón. La inhibición de la PDE5 conduce a la relajación de los músculos lisos vasculares pulmonares.

La HPPN ocurre en neonatos nacidos a término o con una edad gestacional superior a 34 semanas. No hay ningún medicamento en el mercado que contenga sildenafil y que esté indicado para recién nacidos, lo que conlleva inevitablemente a la preparación de fórmulas magistrales adaptadas a este grupo de edad.

La medicina personalizada es un área de investigación difícil, por lo que el objetivo de este trabajo fue el desarrollo, la caracterización y el estudio de estabilidad de dos fórmulas magistrales orales de sildenafil (una de ellas apta para diabéticos) para el tratamiento de la HPPN mediante el estudio de parámetros físico químicos (características organolépticas, cantidad de principio en la fórmula, pH, comportamiento reológico, tamaño de partícula y predicción a largo plazo de la estabilidad física en el caso de la suspensión). También se llevó a cabo el estudio de estabilidad microbiológica. Para ello las fórmulas se almacenaron a 4, 25 y 40 °C protegidas de la luz durante 90 días. Los diferentes parámetros se determinaron a los distintos tiempos pre-fijados según el plan de trabajo.





## Personalised Medicine

## Design and physicochemical stability studies of paediatric oral formulations of sildenafil

N. Provenza<sup>a</sup>, A.C. Calpena<sup>a</sup>, M. Mallandrich<sup>a</sup>, L. Halbaut<sup>a</sup>, B. Clares<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Department of Biopharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja street s/n, 18071 Granada, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 August 2013

Accepted 3 November 2013

Available online 11 November 2013

## Keywords:

Sildenafil oral formulations

Paediatric

Stability

Drug administration

## ABSTRACT

Personalized medicine is a challenging research area in paediatric treatments. Elaborating new paediatric formulations when no commercial forms are available is a common practice in pharmacy laboratories; among these, oral liquid formulations are the most common. But due to the lack of specialized equipment, frequently studies to assure the efficiency and safety of the final medicine cannot be carried out. Thus the purpose of this work was the development, characterization and stability evaluation of two oral formulations of sildenafil for the treatment of neonatal persistent pulmonary hypertension.

After the establishment of a standard operating procedure (SOP) and elaboration, the physicochemical stability parameters appearance, pH, particle size, rheological behaviour and drug content of formulations were evaluated at three different temperatures for 90 days. Equally, prediction of long term stability, as well as, microbiological stability was performed. Formulations resulted in a suspension and a solution slightly coloured exhibiting fruity odour. Formulation I (suspension) exhibited the best physicochemical properties including Newtonian behaviour and uniformity of API content above 90% to assure an exact dosification process.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Sildenafil (SLD) (1-[4-ethoxy-3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d] pyrimidin-5-yl) phenylsulphonyl]-4-methyl piperazine (Fig. 1) is a selective phosphodiesterase inhibitor type 5 (PDE5) that reduces pulmonary vascular resistance (Sola and Baquero, 2007) producing vasodilatation by increasing cyclic guanosine monophosphate an intracellular second messenger that has been implicated in maintaining the low tone of the normal pulmonary vascular bed (Gold et al., 1990).

The use of SLD as a pulmonary vasodilator in infant with congenital heart disease was first reported in a small case series post-operatively in 1999 (Atz and Wessel, 1999). Currently, SLD is used frequently for long-term treatment of children with pulmonary arterial hypertension (Humpl et al., 2005). The incidence of neonatal persistent pulmonary hypertension (PPHN) in term or near-term infants is reported to vary between 0.43 and 6.8 of 1000 live births and mortality remains at 10–20% (Travadi and Patole, 2003). It is characterized by a dysbalance between vasodilatation and vasoconstriction, in which vasoconstriction prevails resulting

in severe pulmonary vascular resistance (Steinhorn et al., 2009). Most prominent histological changes in PPHN include hypertrophy of the perivascular muscular layer in small and large pulmonary arteries (Hoehn, 2007).

SLD was first commercially available as Viagra<sup>®</sup> for the treatment of male erectile dysfunction. Under the trade name of Revatio<sup>®</sup>, it has recently been used for treatment of pulmonary hypertension in adults (Archer and Michelakis, 2009). In this context, personalized medicine is a current and challenging research area because paediatrics are more vulnerable to drug administration errors due to a lack of appropriate drug dosages and strengths for use in this group of patients (Bauters et al., 2012) for this, both community and hospital pharmacists are often challenged with the preparation of a dosage form not commercially available using traditional pharmaceutical compounding techniques as an alternative (Glass and Haywood, 2006). On the other hand the homogeneous distribution of the pure drug is an additional problem if it is formulated in low proportion (Sundell-Bredenberg and Nyström, 2001).

Up to 37% of the drugs used in community practice settings and up to 80% of the drugs used in neonatal intensive care, are prescribed in an off-label or unlicensed manner (Wilson et al., 1998). In addition the use of the active pharmaceutical ingredient (API) by modifying commercially available tablets or capsules is not allowed by legislation in some countries (Santoveña et al., 2012). For this reason, in the design and formulation of dosage forms the physical, chemical and biological properties of the active substance, as well

\* Corresponding author at: Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja street s/n, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: [beatrizclares@ugr.es](mailto:beatrizclares@ugr.es) (B. Clares).

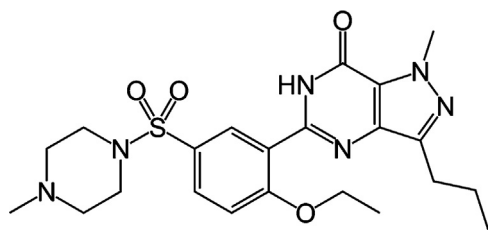


Fig. 1. Chemical structure of sildenafil.

as, the rest of pharmaceutical ingredients used should be seriously considered (Nahata and Allen, 2008).

Orally administered liquids are still considered the standard forms for these patients (Bauters et al., 2012), because a single liquid paediatric preparation may be used for infants and children of all ages, with the dose of the drug varied by the volume administered (Allen, 2008) reducing potential dosage mistakes, and helping the treatment adherence. The absence of suitable medicines, critical safety or efficacy information bears various risks as continuously claimed by different organizations particularly with this vulnerable patient population (Ernest et al., 2007; Wening and Breitzkreutz, 2011).

Most common types of drug administration errors are incorrect time of administration (28.8%), followed by incorrect drug preparation (26%), omission errors (16.3%) and incorrect dose (11.5%), and many studies have reported the dosing errors as the most common (Chua et al., 2010). However, a major problem remains with many liquid preparations due to the absence of information regarding suitability and stability (Brion et al., 2003). The variability in the design of such preparations, sometimes with an unknown or low stability, leads to the possibility of medication errors when handling dosages. On the other hand, no dose or stability control is performed in community or hospital pharmacies for every formulation prepared (Santoveña et al., 2012). For this reason, there are no studies either about the quality of the final product or about the dose homogeneity to be administered.

Therefore, the purpose of the present work was the design of paediatric oral formulations of SLD and the development of a simple and feasible SOP for its use by pharmacist both in community and hospital facilities. The physicochemical and microbiological stability of two different formulations (2 mg/mL) of SLD (pure powder) were evaluated to guarantee the correct dose administration, the efficiency of the treatment and the formulation stability during its preparation and storing.

## 2. Materials and methods

SLD citrate and excipients were pharmacopoeia grade and were provided by Acofarma S.A. (Barcelona, Spain). All other chemicals were all of analytical grade (Sigma–Aldrich, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q® Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain).

### 2.1. General SOP

Compositions of the developed formulations of SLD are reported in Table 1 and were elaborated according to the following SOP: SLD is accurately weighed and added to the right amount of buffer citrate solution and water, and then the mixture is sonicated for 5 min. Subsequently, the vehicle (excipient for syrup in formulation I and excipient for syrup sugar free in formulation II) are slowly added. Finally, mixtures are completed with water until reaching the volume and newly sonicated until homogeneity.

Table 1  
Formulations composition.

Ingredients	Formulation 1	Formulation 2
Sildenafil citrate (mg)	200	200
Citrate buffered solution 0.1 M (pH = 4) (mL)	10	10
Excipient for syrup (mL)	45	–
Excipient for syrup sugar free (mL)	–	45
Bidistilled water (mL)	q.s. 100	q.s. 100

As controls, the same amounts of formulations without drug (blank samples) were similarly prepared.

### 2.2. Physicochemical characterization of formulations

Aliquots of 10 mL of the suspensions were stored in amber glass containers at three different temperatures (4, 25 and 40 °C) for 90 days. Measures were performed at pre-selected times and comprised physicochemical testing of quantifiable parameters which could possibly change during storage period, such as appearance, pH, particle size, rheological behaviour, and drug concentration. Preparations are considered stable if physical characteristics have not changed and drug concentration has remained above 90% of the original concentration.

#### 2.2.1. Appearance

The physical appearance properties were studied using a visual examination method of the samples stored at each temperature, thus parameters as odour, colour or tendency to spontaneously form precipitates could be appreciated.

#### 2.2.2. pH measurements

pH values were measured in triplicate using a digital pH/mV-meter micro-pH 200 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). A significant variance of pH over an adequate value per each formula could indicate a degradation of the pharmaceutical compounding or an erroneous elaboration.

#### 2.2.3. Particle size

Particle size analysis of formulation 1 was carried out by laser diffractometry (LD) using a Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments, Malvern, UK) yielding the volume distribution of the particles. The average particle size distribution was measured from 3 replicates of each sample. For the LD analysis the diameters 10%, 50% and 90% were used. Measurements of the samples stored 25 °C were performed at 0 and 90 days.

#### 2.2.4. Rheological behaviour

The rheological characterization of the formulations was performed at 25 °C using a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with a parallel plate geometry set-up with a fixed lower plate and an upper plate (Haake PP60 Ti, 6 cm diameter). Different gaps between plates were tested and a separation of 0.5 mm was selected. The rheometer was connected to a computer provided with the software HAAKE RheoWin® Job Manager V. 3.3 to carry out the test and RheoWin® Data Manager V 3.3 (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) to carry out the analysis of the obtained data. Viscosity curves and flow curves were recorded for 3 min during the ramp-up period from 0 to 100 s<sup>-1</sup>, 1 min at 100 s<sup>-1</sup> (constant shear rate period) and finally 3 min during the ramp-down period from 100 to 0 s<sup>-1</sup>. Viscosity values at 100 s<sup>-1</sup> were determined at  $t_0$  and  $t = 90$  days for the samples stored at 4, 25 and 40 °C in triplicate.

### 2.2.5. Dose content and quantification method

The API content in samples was calculated in triplicate using the methodology described below. For this, 1 mL of sample (equivalent to 2 mg of SLD) was added to 100 mL in glass amber volumetric flask obtaining a final SLD concentration of 20 µg/mL. This solution was sonicated in an ultrasonic bath p-selecta 514 (Vidrafoc, Barcelona, Spain) for 1 min.

Absorbance of the samples was conducted by an Amersham Biosciences Ultrospec 1100 Pro UV/Visible spectrophotometer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at room temperature in 1 cm quartz cells at 292.5 nm.

Working standard solutions for the calibration curves were prepared daily as follows; 25 mg of SLD was accurately weighed and transferred to a 25 mL volumetric flask. Then it was dissolved in glacial acetic acid 0.1 M to obtain a final SLD concentration of 1000 µg/mL. From this solution, six standard stocks were prepared.

Validation of the developed methodology was carried out as per the international conference on harmonization guidelines Q2 (R1) (ICH, 2006) and included an evaluation of the following characteristics: linearity, sensitivity, accuracy and precision.

The linearity of the present method was evaluated by constructing the calibration curve at six concentration levels from 50 to 0.87 µg/mL. The calibration curve was validated interday ( $n=6$ ) by different analysts and developed by plotting the instrument measurements versus the corresponding drug concentration. The least squares fit method was employed to statistically evaluate the results for linearity by a regression line and the corresponding slope,  $y$ -intercept and coefficient of linear correlation ( $r^2$ ). Furthermore, linearity was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) test to compare the absorbances versus nominal concentrations of each standard, and differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The least square linear regression analysis and mathematical determinations were performed by the Prism<sup>®</sup>, V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

The selectivity of different assays was confirmed by the individual analysis of blank samples assuring that no interferences took place.

Sensitivity of the method was determined with respect to limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). LOD provides information on minimum level at which the SLD was reliably detected by the analysis of samples with known concentrations of SLD and LOQ, in the same way, establishes the minimum level at which SLD was quantified with acceptable accuracy and precision. Both parameters, LOD and LOQ were determined based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve using the formula:

$$\text{LOD or LOQ} = k \times \frac{\text{SD}_{\text{Sa}}}{\text{Sb}} \quad (1)$$

where  $k$  is the a factor related to the level of confidence, its value is 3.3 for LOD and 10 for LOQ,  $\text{SD}_{\text{Sa}}$  is the standard deviation of the intercept and  $\text{Sb}$  is the slope (McEvoy et al., 2007).

Accuracy was defined as the percentage of the systematic error, which is determined as standardized agreement between the measured value and the true value (relative error < 10%). Finally, the precision of the assay was determined by the intraday repeatability, for this, the relative standard deviation (RSD) of replicates analyzed during the same day (while keeping the operating conditions identical) was calculated. Similarly, the intermediate precision (interday) was assessed by repeated analysis of the control samples in six different days.

### 2.2.6. Stability studies

Homogeneity of the formulations was examined over time (0, 7, 15, 30, 60 and 90 days) at three temperatures to ensure that

every vial contained no less than 90% and no more than 110% of the theoretically calculated and labelled amount of SLD per unit of volume (The United States Pharmacopoeia, 2007). Six samples were taken from each vial and SLD content was calculated using the methodology described above. The relative standard deviation (%RSD) was used to assess the homogeneity of the suspensions.

### 2.3. Optical stability study

In order to predict the long term stability of formulation 1, Measurements of suspensions by multiple light scattering were performed in triplicate using the Turbiscan<sup>®</sup> Lab (Formulation Co., L'Union, France), an optical instrument that characterizes concentrated dispersions. The analyzed suspension is placed on a cylindrical glass measuring cell. The light source is a pulsed near infrared ( $\lambda = 880$  nm). Undiluted samples (35 mL) were placed and kept on a cylindrical glass measuring cell which was completely scanned by a reading head. A pattern of the light flux as a function of the sample height was obtained, giving a macroscopic fingerprint of the sample at a given time. Measurements were performed at room temperature.

### 2.4. Microbiological studies

Microbiological tests of formulations were performed at 0 and 90 days according to the European Pharmacopoeia monograph of non-sterile products (European Pharmacopoeia, 2013). The microbial count was considered to be the average number of colony forming units (cfu) found in agar. Liquid oral formulations would meet microbial requirements if the total aerobic microbial count were less than  $10^2$  cfu/mL, the total combined yeast/mould count less than  $10^1$  cfu/mL and confirmed the absence of *Escherichia coli*.

### 2.5. Statistical analysis

Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by  $t$ -student test and represented as the mean of  $n$  replicates  $\pm$  SD. The level of significance was set at  $p < 0.05$  using Prism<sup>®</sup>, V. 3 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Physicochemical characterization and stability

The development of age appropriate paediatric formulations is paramount to enable children adherence to treatment. It encompasses multi-dimensional considerations including the administration route, the formulation technology, the dosage strength and other parameters as organoleptic properties, viscosity and pH. For oral treatments, organoleptic characteristics are crucial for children compliance to therapeutic regimens. EMA paediatric investigation plan guidelines point out the particular relevance of organoleptic testing in the development of oral treatment for children (European Medicines Agency (EMA), 2006). The loss of pharmacological and sensory attributes depends on both the type of elaboration or storage process and the sensitivity of specific pharmaceutical components. Storage is accompanied by many changes, including chemical reaction and physical and structural changes which affect both pharmacological and sensory qualities. In paediatric solutions generally involves a series of interdependent phenomena. These processes affect, to a varying degree, the quality attributes of colour, texture and pH.

Colour is an important attribute in pharmaceutical products, since it is perceived immediately by the consumer. It can also be a measurement of reactions extension in medicine since formed



and/or degraded compounds may contribute to a specific colouration.

After preparation ( $t=0$ ) formulation 1 resulted to be a re-dispersible suspension, slightly pink with a characteristic fruity odour. There were no detectable changes in colour or odour in any sample during the two months of storage at the three controlled temperatures. On the other hand, formulation II (glucose free) resulted in a transparent solution also exhibiting light pink colour and fruity odour. When the vials were observed at naked eye after 7 days, it could be seen a white sediment non resolvable by shaking. This sediment was observed in samples stored at 4°C. This event was subsequently also corroborated by the SLD dose uniformity assay, from which, a noticeable reduction of the API in solution (formulation II) was detected at  $t=7$  days. pH measurements showed values around 4.2 at  $t_0$ , these values remained almost constant over time, and thus no statistically significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) probably due to the presence of the citrate buffer that ensured a constant acid pH allowing SLD to keep solubilized in formulation II, because this pH value corresponds with the maximum solubility of SLD. The different solubility behaviour of SLD in those two simple syrups excipients utilized could be explained by the minor content of water in the syrup excipient with glucose compared to glucose free, what might difficult the API solubility in formulation I. Equally, the influence of the temperature on pH was studied by one-way ANOVA and no statistically significant differences were showed for any formulation ( $p = 0.7163$  and  $0.8227$ , formulation I and II respectively). However, despite significant differences were recorded as a function of time ( $p < 0.05$ ), these were not considered relevant.

Particle size of the API in suspension can affect the uniformity of content since large particles will settle faster than their smaller counterparts (FDA, 2009). Equally, particle size distribution in the finished drug product dosage form is a critical parameter that significantly impacts the bioavailability and pharmacokinetics of the product (Kulshreshtha et al., 2010). Results of the particle size study of formulation I showed that size distribution at  $t_0$  were  $d_{10\%} = 3.24 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ,  $d_{50\%} = 10.94 \pm 0.1 \mu\text{m}$  and  $d_{90\%} = 31.36 \pm 0.5 \mu\text{m}$ . A slight increase on day 90 compared to day

0 was observed in  $d_{50\%}$  and  $d_{90\%}$  with values of  $12.86 \pm 0.7$  and  $35.85 \pm 0.4 \mu\text{m}$  respectively.

Oral viscosity plays an important role in the textural appreciation of liquid or fluid pharmaceuticals. Oral assessments of viscosity correlate with both small-deformation and large-deformation rheological but there is still much speculation as to what forces actually operate in the mouth. Viscosity measurements have been performed with an imposed shear rate and the resulting shear stress was measured. With this type of test, it can be determined if the material is characterized by linear-viscous (Newtonian) behaviour (shear stress exponent  $n=1$ ) in the investigated shear rate range or if it shows power-law behaviour ( $n \neq 1$ ). The potential dependence of the viscosity of the formulations on the shear rate is shown in Fig. 2. Formulation I graph shows constant viscosity values with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$  with constant slope that gives rise to a line, and thus Newtonian behaviour (Lee et al., 2009). Formulation II curve showed a small dependence on shear rate, showing a consistent, although relatively small, decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ . This is the typical behaviour of pseudoplastic fluids. In this case, the hysteresis loop is inappreciable, indicative that this solution did not show thixotropy. It could be probably due to the presence of xanthan gum in formulation II (simple syrup glucose free excipient) the shearing action on the long chain molecule of xanthan gum. As the shearing stress is increased, the disarranged molecules start to align their long axes in the direction of the flow. This orientation reduces the resistance which further allows lowering of viscosity at increasing shearing stress (Martin, 1993). This result is in accordance with previous reports where it is mentioned that xanthan gum exhibits plastic or pseudoplastic flow (Ofner et al., 1996).

Viscosity values at  $100 \text{ s}^{-1}$  were  $2.9 \pm 0.10 \text{ mPa s}$  and  $10.70 \pm 0.2 \text{ mPa s}$  for formulation I and II respectively after preparation at  $t_0$ . The presence of xanthan gum in formulation II (simple syrup glucose free excipient) resulted in a substantial increase of the viscosity value with respect to Formulation I. No statistically significant differences were observed at the end of the storage period (90 days) at any temperature indicative of a desired rheological stability. This stability is an important requirement

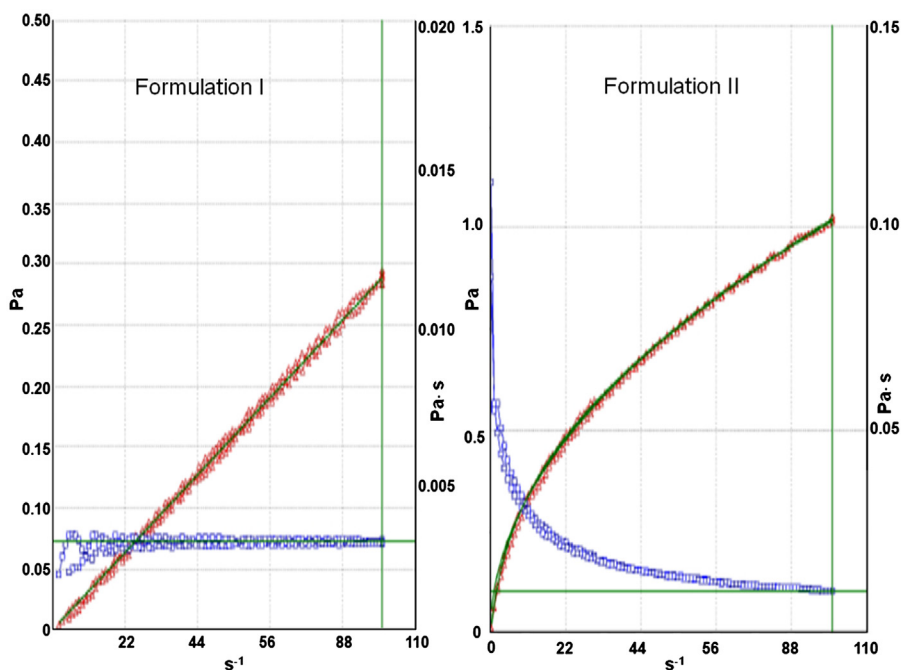


Fig. 2. Formulations rheograms. It shows the shear stress (Pa) (in red) and the viscosity (Pa s) (in blue). (For interpretation of the references to color in this text, the reader is referred to the web version of the article.)

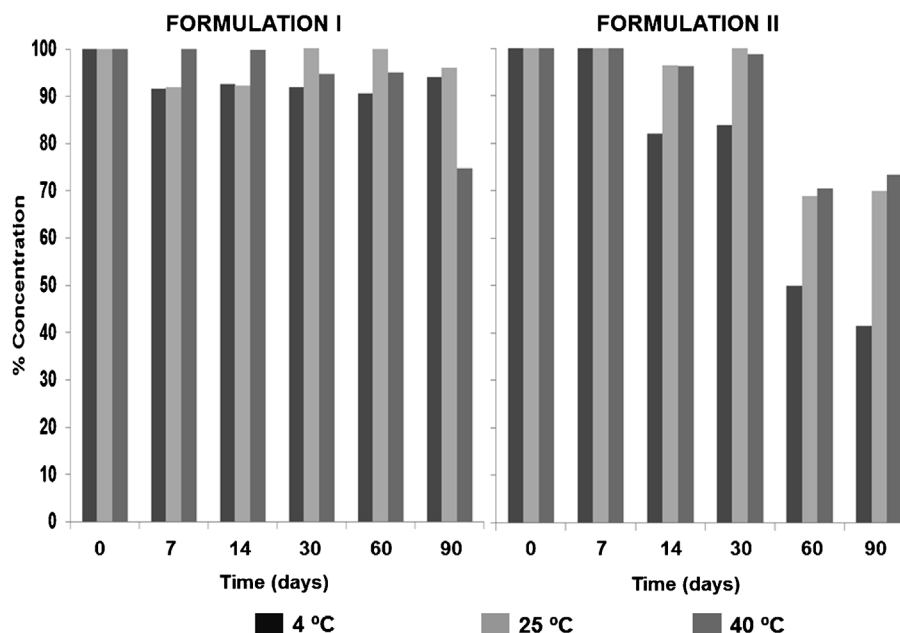


Fig. 3. Drug content (%) in developed formulations over time at three temperatures.

because the dosification process should ensure uniform distribution of the API in a suspension, especially among paediatric patients.

According to the obtained results of the method validation, the analytic method was lineal confirmed by the ANOVA of the linear regression ( $p > 0.05$ ) with determination coefficients ( $r^2$ )  $> 0.99$  in all curves. The LOD was  $0.32 \pm 0.54 \mu\text{g/mL}$  and LOQ  $0.97 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ . Accuracy (as relative error) as the percent deviation from the nominal concentration did not vary more than 10% from the expected. Precision in analysis in % RSD values were less than 15%.

Regarding uniformity of API content, as is shown in Fig. 3 the concentration of SLD in formulation I was maintained above 90% at 4 and 25 °C for 90 days, however at 40 °C this content was observed for 60 days. On the other hand, drug content in formulation II was maintained constant (above 90%) at 25 and 40 °C for 30 days, but at 4 °C this SLD content was achieved only for 7 days, at  $t = 15$  the drug concentration was  $82.0 \pm 0.9\%$ , and  $83.1 \pm 0.7\%$  after 30 days. This decrease was confirmed by the presence of a white sediment making manifest the influence of low storage temperature in the solubility of the API.

### 3.2. Optical stability assay

Turbiscan® Lab is considered as a device which predicts the stability, being able to detect the formula destabilization before than the classical stability methods (microscopy, spectroscopy, turbidity and particle size analysis) easily up to 50 times earlier than the naked eye (Fernández Campos et al., 2012). Moreover, it provides real-time information on the destabilization process. When sedimentation process is produced, a backscattering increase versus time at the bottom of the sample is observed. When the sample suffers a creaming process, an increase of backscattering versus time on the top of the vial is observed. If the destabilization phenomenon occurs due to particle aggregation, a backscattering increase versus time can be observed over the whole height of the sample (Celia et al., 2009). If backscattering profiles have a deviation of  $\pm 2\%$  it can be considered that there are no significant variations on particle size. Variations up to  $\pm 10\%$  indicate instable formulations.

Fig. 4 shows migration phenomena by local variations of the backscattering of formulation I corresponding to measurements on different hours. The left side of the curves corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the top. As expected, it was an unstable system; it can be observed an increase of backscattering in the middle of the vial possibly due to the formation of aggregates by coalescence or flocculation. No flotation phenomenon was observed. These results were in accordance with those of particle size distribution, in which, at  $t = 90$  days an increase was recorded. Particles in suspension possess a surface free energy that makes the system unstable leading to particle settling. Free energy of the system depends on the total surface area and the interfacial tension between the liquid medium and the solid particles. Thus, in order to minimize this free energy, the system tends to decrease the surface area, which is achieved by formation of agglomerates (Kulshreshtha et al., 2010).

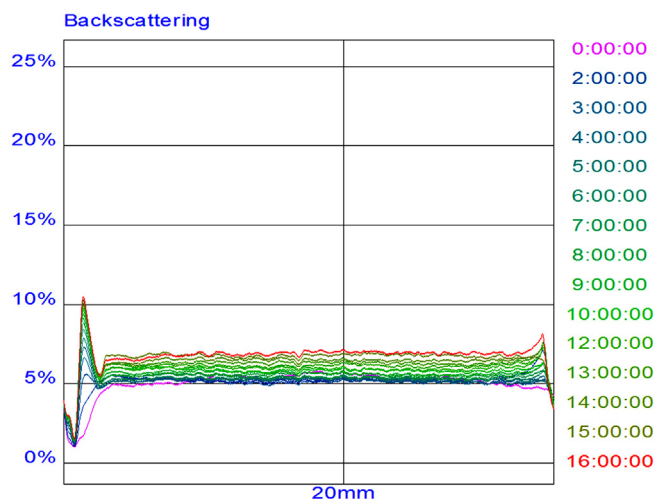


Fig. 4. Transmission profiles of formulation I. The left side of the curve corresponds to the bottom of the vial, whereas the right side corresponds to the sample behaviour on the top of the vial.

### 3.3. Microbiological studies

Microbial contamination in non sterile liquid formulations may cause foul odour, turbidity, and adversely affect to the palatability and appearance. Otherwise, high level of microorganisms may be hazardous to health especially in immunocompromised patients.

For both formulations no *E. coli* contamination was observed and total bacteria count was less than  $10^2$  cfu/g on day 90 of the study. Fungal contamination was also less than  $10^1$  cfu/g in both. These results indicated that both formulations complied with the European Pharmacopoeia specifications on microbial examination of non-sterile product throughout 90 days.

## 4. Conclusions

Two new oral liquid formulations of SLD for paediatric use have been developed from pure powder, a suspension (formulation I) and a solution (formulation II), this latter suitable for diabetic patients. From obtained results it could be concluded that formulation I was stable from a physicochemical and microbiological point of view for 90 days at 4 and 25 °C, whereas at 40 °C the API content remained constant in the acceptable limits for 60 days. On the other hand formulation II was stable for 30 days when was stored at 25 and 40 °C, however at 4 °C API concentrations under 90% were recorded at day 15, this reduction was accompanied by the emergence of a non redispersible sediment, suggesting a decrease of SLD solubility at low temperature.

Obtained results also suggested that pH did not show statistically significant differences with the assayed conditions and the rheological behaviour also remained constant in both formulations. Finally formulations were microbiologically stable for at least 90 days. All these findings make possible to guarantee a correct dosification and administration of SLD when is formulated in liquid oral forms for the treatment of PPHN.

## Acknowledgment

The authors would like to thank Acofarma S.A. for supplying sildenafil citrate and excipients.

## References

- Allen, L.V., 2008. Dosage form design and development. *Clin. Ther.* 30, 2102–2111.
- Archer, S.L., Michelakis, E.D., 2009. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 361, 1864–1871.
- Atz, A.M., Wessel, D.L., 1999. Sildenafil ameliorates effects of inhaled nitric oxide withdrawal. *Anesthesiology* 91, 307–310.
- Bauters, T., Claus, B., Willems, E., De Porre, J., Verlooy, J., Benoit, Y., Robays, H., 2012. What's in a drop? Optimizing strategies for administration of drugs in pediatrics. *Int. J. Clin. Pharm.* 4, 679–681.
- Brion, F., Nunn, A.J., Rieutord, A., 2003. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. *Acta Paediatr.* 92, 486–490.
- Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D., Fresta, M., 2009. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf. B: Biointerface.* 72, 155–160.
- Chua, S.S., Chua, H.M., Omar, A., 2010. Drug administration errors in paediatric wards: a direct observation approach. *Eur. J. Pediatr.* 169, 603–611.
- 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. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 1043–1055.
- European Medicines Agency (EMA), 2006. [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg\\_2006.1901/reg\\_2006.1901\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2006.1901/reg_2006.1901_en.pdf) (accessed 25.08.13.).
- European Pharmacopoeia 7.0. <http://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-publications-1401.html> (accessed 25.08.13.).
- FDA, 2009. <http://www.fda.gov/oc/inspections/inspectionguides/ucm074935.htm> (accessed 25.08.13.).
- Fernández Campos, F., Calpena Campmany, A.C., Rodríguez Delgado, G., López Serano, O., Clares Naveros, B., 2012. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J. Pharm. Sci.* 101, 3739–3752.
- Glass, B.D., Haywood, A., 2006. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9, 398–426.
- Gold, M.E., Wood, K.S., Byrns, R.E., Fukuto, J., Ignarro, L.J., 1990. NG-methyl-L-arginine causes endothelium-dependent contraction and inhibition of cyclic GMP formation in artery and vein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4430–4434.
- Hoehn, T., 2007. Therapy of pulmonary hypertension in neonates and infants. *Pharmacol. Ther.* 114, 318–326.
- Humpal, T., Reyes, J.T., Holtby, H., Stephens, D., Adatia, I., 2005. Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension: twelve-month clinical trial of a single-drug, open-label, pilot study. *Circulation* 111, 3274–3280.
- ICH, 2006. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). <http://www.ema.europa.eu> (accessed 28.08.13.).
- Kulshreshtha, A.K., Singh, O.N., Wall, G.M., 2010. Pharmaceutical suspensions. In: *From Formulation Development to Manufacturing*. Springer, New York.
- Lee, C.H., Moturi, V., Lee, E., 2009. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J. Control. Release* 136, 88–98.
- Martin, A., 1993. *Physical Pharmacy*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- McEvoy, E., Donegan, S., Power, J., Altria, K., 2007. Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 137–143.
- Nahata, M.C., Allen, L.V., 2008. Extemporaneous drug formulations. *Clin. Ther.* 30, 2112–2119.
- Ofner, C.M., Schnaare, R.L., Schwartz, J.B., 1996. Reconstitutable oral suspensions. In: *Lieberman, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S. (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperses Systems*. Marcel Dekker, New York, pp. 247–249.
- Santoveña, A., Hernández-Paiz, Z., Fariña, J.B., 2012. Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. *Int. J. Pharm.* 423, 360–364.
- Sola, A., Baquero, H., 2007. Oral sildenafil in neonatal medicine: tested in adults also used in neonates. *An. Pediatr.* 66, 167–176.
- Steinhorn, R.H., Kinsella, J.P., Pierce, C., Butrous, G., Dilleen, M., Oakes, M., Wessel, D.L., 2009. Intravenous sildenafil in the treatment of neonates with persistent pulmonary hypertension. *J. Pediatr.* 155, 841–847.
- Sundell-Bredenberg, S., Nyström, C., 2001. The possibility of achieving an interactive mixture with high dose homogeneity containing an extremely low proportion of a micronized drug. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 285–295.
- The United States Pharmacopoeial Convention, 2007. *Compounded preparations. The United States Pharmacopoeia 30—The National Formulary 25*, vol. 1. Port City Press, Baltimore, pp. 332.
- Travadi, J.N., Patole, S.K., 2003. Phosphodiesterase inhibitors for persistent pulmonary hypertension of the newborn: a review. *Pediatr. Pulmonol.* 36, 529–535.
- Wening, K., Breikreutz, J., 2011. Oral drug delivery in personalized medicine: unmet needs and novel approaches. *Int. J. Pharm.* 404, 1–9.
- Wilson, D.G., MvArtney, R.G., Newcombe, R.G., McArtney, R.J., Gracie, J., Kirk, C.R., Stuart, A.G., 1998. Medication errors in paediatric practice: insights from a continuous quality improvement approach. *Eur. J. Pediatr.* 57, 769–774.

## **2. DEVELOPMENT, PHYSICAL-CHEMICAL STABILITY, AND RELEASE STUDIES OF FOUR ALCOHOL-FREE SPIRONOLACTONE SUSPENSIONS FOR USE IN PEDIATRICS.**

La insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) asociada a defectos congénitos se manifiesta en aproximadamente 0,1-0,2% de los nacidos vivos.

Aparte de la cirugía, el principal enfoque para el tratamiento de la ICC es el tratamiento farmacológico. Los diuréticos se utilizan en el tratamiento de esta patología por razones obvias. Entre ellos, el uso de espironolactona en lactantes y niños fue reportado por primera vez en 1964 y a partir de entonces ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de la ICC pero únicamente se encuentra comercializada en forma de cápsulas o comprimidos o a dosis más altas que las necesarias para la población pediátrica.

En este trabajo se desarrollaron cuatro formulaciones magistrales (suspensiones) de espironolactona (5 mg/ml) libres de alcohol, aptas para uso pediátrico. El objetivo de este estudio fue doble:

- Por un lado, se determinó y comparó la estabilidad física y química de las suspensiones almacenadas a 4, 25 y 40 °C durante un período de 60 días. Las características organolépticas, el contenido de espironolactona, el pH, el comportamiento reológico y la viscosidad, el tamaño de partícula así como la predicción de la estabilidad física a largo plazo, se evaluaron en los tiempos pre-fijados según el plan de trabajo. También se realizó el estudio microbiológico de la mejor fórmula.
- Por otro lado, se evaluó la influencia de los excipientes sobre la liberación de espironolactona (5mg/ml) de las cuatro suspensiones. Se determinó el perfil de disolución de cada suspensión y se comparó con el de los comprimidos comercializados. Los estudios de disolución han adquirido gran importancia porque, en la mayoría de los casos, la disolución del fármaco es el paso limitante de la velocidad en el proceso de absorción.



# Development, Physical-Chemical Stability, and Release Studies of Four Alcohol-Free Spironolactone Suspensions for Use in Pediatrics

e-mail: nora.provenza@hotmail.com  
nprovebe7@alumnes.ub.edu

Nora Provenza Bernal<sup>1,\*</sup>, Ana C. Calpena<sup>1</sup>, Mireia Mallandrich<sup>1</sup>,  
Adolfina Ruiz<sup>2</sup>, and Beatriz Clares<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada. Campus of Cartuja street s/n, 18071 Granada, Spain

## ABSTRACT

Dissolution studies have become of great significance because, in most cases, drug dissolution is the rate-limiting step in the absorption process. As occurs with solid oral dosage forms, heterogeneous dispersed systems (suspensions) could also have some problems with their in vitro dissolution.

The objective of this study was to evaluate the influence of excipients on the release of spironolactone from four alcohol-free suspensions (pharmaceutical compounding) of spironolactone 5 mg/mL suitable for pediatric use.

In addition, the comparison of the physical and chemical stability of the suspensions stored at 4, 25, and 40 °C over a 60-day period has been studied. Rheological behavior, particle size, a prediction of long-term physical stability, pH, and assay of spironolactone by HPLC were assessed at preset times. The dissolution profile of each suspension was determined and compared with that of the commercial tablets. A microbiological study of the best formula was also performed. Chemically, the four spironolactone suspensions were stable for 60 days stored at three temperatures; Suspension IV had optimum pH values and the highest recovery percentage. In terms of physical stability, sedimentation occurred in Suspension IV, and flotation of spironolactone occurred in Suspensions I, II, and III. Suspension III had the highest viscosity and the slowest drug release. Suspension IV was also microbiologically stable for 60 days. In conclusion, Suspension IV had the best properties. The least suitable form was Suspension III, as its high viscosity made it difficult to achieve homogeneous redispersion and it had the slowest dissolution profile.

**KEYWORDS:** Spironolactone, oral suspension, pediatrics, dissolution.

## INTRODUCTION

Spironolactone is a competitive aldosterone antagonist that acts at the distal convoluted renal tubule to increase sodium and water excretion and reduce potassium elimination (1). The use of spironolactone in infants and children was first reported in 1964 (2) when administration of the drug to three infants produced moderate diuresis. Since then, spironolactone has been widely utilized in the management of congestive heart failure associated with congenital heart disease (3–5), bronchopulmonary dysplasia or chronic lung disease (5–7), and pediatric ascites (8, 9).

In many countries, spironolactone is marketed only as tablets. This is an ongoing problem for some groups of the population such as children, patients who cannot swallow solid dosage forms, patients who must receive medications via nasogastric or gastrostomy tubes, and patients who require nonstandard doses that are more easily and accurately measured using a liquid formulation (10).

From birth to adulthood, a series of anatomical, physiological, and biochemical modifications are produced that affect the absorption, distribution, metabolism, and excretion of drugs and their mechanisms of action, as well as enzyme synthesis and the production and distribution of receptors (11, 12). Thus, drug prescribing must be based on knowledge of pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics (13).

Studies of novel dosage forms, such as mini-tablets, that are more appropriate for children (14) are now being carried out. However, orally administered liquids are still considered one of the standard forms for this population. Extemporaneous oral liquid medicines are easily prepared and allow dosage flexibility (1, 15). A single liquid pediatric preparation may be used for infants and children of all ages, with the dose of the drug varied by the volume administered (16). It is common practice for liquid dosage forms to be prepared from a commercially available oral solid dosage by simply crushing tablets or opening a capsule (10). However, the use of an active pharmaceutical ingredient (API) obtained by modifying a commercially available tablet or capsule could have clinical and legal implications (17).

\*Corresponding author.

Therefore, due to the lack of products tailored to the needs of this population, especially newborns, pharmaceutical compounds (solutions or suspensions) need to be prepared as an alternative to marketed tablets. However, there is limited information on the suitability and stability of liquid preparations (18). The variability in the design of such preparations, sometimes with unknown low stability, leads to the possibility of medication errors in the handling of the dosages. Furthermore, dosage or stability control is not carried out in pharmacies or hospitals, as the indicators are determined by methods such as high performance liquid chromatography (HPLC) that require considerable effort (19).

Over the last 30 years, many extemporaneously prepared spironolactone-containing oral liquid formulations have been reported in the literature (1, 20–26), and data on their physical and chemical stability have been gathered. However, some of them were prepared using crushed tablets; others contain alcohol, which is not desirable for children, to improve stability or drug solubility. Due to genetic polymorphism, metabolism of alcohol could differ among races. As these preparations are addressed to a pediatric population, it is desirable to avoid the presence of alcohol in these formulations. Other studies were carried out at a different temperature. Therefore, the purpose of the present study was to investigate four alcohol-free suspensions of spironolactone (pure powder) that are suitable for a pediatric population and compare their physical and chemical stability at three different temperatures, to ensure the quality and the right preparation and storage of these preparations. Additionally, to assess the influence of the excipients on the release of the active substance, the dissolution profile of each suspension was analyzed and compared with that of the marketed tablets. A microbiological study of the best formulation was also carried out.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

Spironolactone, simple syrup, glycerin, carboxymethylcellulose, Excipient Acofar for Syrup (sucrose, water, sorbitol, glycerin, coloring, citric acid, methylparaben, potassium sorbate, sodium phosphate, and coloring), and Excipient Acofar for Suspensions (water, sodium carboxy-

methylcellulose, cellulose gum, citric acid, calcium sulfate, sodium phosphate, methylparaben, carrageenan, xanthan gum, potassium sorbate, sucrose, sorbitan triesterate, PEG-40 stearate, dimethicone, and silica) were purchased from Acofarma, S.A. (Barcelona, Spain). The tablets containing 25 mg of spironolactone (commercially available in Spain) that were used for the dissolution test were purchased from a community pharmacy. Methanol was purchased from Panreac (Barcelona, Spain), and double-distilled water was used after filtration in a Milli-Q Gradient A10 system apparatus (Millipore Ibérica S.A.U., Madrid, Spain). All chemicals were of analytical grade.

### Preparation of Spironolactone Suspensions

The composition of the four suspensions of spironolactone is shown in Table 1.

To make Suspension I (Spl), simple syrup was placed in a glass container and spironolactone was added to the simple syrup under mechanical stirring (UltraTurrax, Ika, Germany) until a homogeneous suspension was achieved. To prepare Suspension II (SpII), spironolactone was mixed with glycerin until a homogeneous white paste was formed. Then, simple syrup was added slowly under stirring. To prepare Suspension III (SpIII), spironolactone was mixed with glycerin until a homogeneous white paste was formed. Then, 20 g of a carboxymethylcellulose gel prepared the day before at a concentration of 1% was added. Once everything was well mixed, simple syrup was added slowly under magnetic stirring. For the preparation of Suspension IV (SpIV), spironolactone was mixed with glycerin until a homogeneous white paste was formed. Then, Excipient Acofar for Suspension was added under stirring, and finally the mixture was brought to volume with Excipient Acofar for Syrups. As a control, the same amounts of each formulation (Spl, SpII, SpIII, and SpIV) without spironolactone (blank samples) were prepared similarly. All the formulations, with and without spironolactone, were stored under the same conditions for further analysis.

### Stability Test and Suspension Characterization

After the preparation, aliquots of 10 mL of the suspensions were stored in amber glass vials at three temperatures (4, 25, and 40 °C) for 2 months. Measures were performed at selected times at 0, 7, 15, 30, and 60 days.

**Table 1. Spironolactone Suspension Composition**

Component	Spl	SpII	SpIII	SpIV
Spironolactone (mg)	500	500	500	500
Glycerin (% m/v)	-	10	10	5
Carboximethylcellulose (% m/v)	-	-	0.2	-
Simple syrup (mL)	q.s. 100	q.s. 100	q.s. 100	-
Excipient Acofar for Suspensions (mL)	-	-	-	50
Excipient Acofar for Syrups (mL)	-	-	-	q.s. 100

Analyses involved the physical and chemical testing of quantifiable parameters that could possibly change during storage, such as appearance, rheological behavior, particle size, optical stability by multiple light scattering, pH, and active substance quantity. Microbiological stability was also assessed.

Preparations were considered stable if the physical characteristics did not change and the drug concentration remained greater than 90% of the original concentration (1).

## Physical Stability

### Appearance

The samples stored at each temperature were visually examined to assess parameters such as odor, color, and tendency to precipitate or float.

### Rheological Behavior

The rheological behavior of the formulations was assessed at 25 °C using a rotational HAAKE Rheostress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with a parallel plate geometry setup, with a fixed lower plate and an upper plate (Haake PP60 Ti, 6 cm diameter). Different gaps between plates were tested, and a separation of 0.5 mm was selected. Viscosity curves and flow curves ( $n = 3$ ) were recorded for 3 min during the ramp-up period from 0 to 100  $s^{-1}$ , 1 min at 100  $s^{-1}$  (the constant shear rate period), and 3 min during the ramp-down period from 100 to 0  $s^{-1}$ . The viscosity values at 100  $s^{-1}$  were determined at  $t_0$  and  $t = 60$  days for the samples stored at 4, 25, and 40 °C.

Data from the flow curve (when it showed that the fluid was non-Newtonian) were fitted to various mathematical models: Ostwald–de Waele, Carreau–Yasuda, Cross, and Herschel–Bulkley.

Ostwald–de Waele	$\tau = k \times (\dot{\gamma})^n$
Carreau–Yasuda	$\tau = \frac{\dot{\gamma} (\eta_0 - \eta_\infty)}{(1 + (\lambda \dot{\gamma})^a)^{(1-n)/a}}$
Cross	$\tau = \frac{\dot{\gamma} (\eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty))}{1 + (\dot{\gamma} / \dot{\gamma}_0)^n}$
Herschel–Bulkley	$\tau = \tau_0 + k_1 \times (\dot{\gamma})^n$

where  $\tau$  is the shear stress,  $\dot{\gamma}$  is the shear rate (1/s),  $\tau_0$  is the yield shear stress (Pa),  $\dot{\gamma}_0$  is the zero shear rate (1/s),  $\eta$  is the infinite shear rate viscosity,  $\eta_0$  is the zero shear rate viscosity (Pa·s),  $k$  is the consistency coefficient(s), and  $n$  is a dimensionless rate constant. The fluid is Newtonian if  $n = 1$ , pseudoplastic if  $0 < n < 1$ , and dilatant if  $n > 1$ .

### Particle Size

The particle size distribution (PSD) of the spironolactone suspensions was carried out by laser diffraction (LD, 2000E

Mastersizer, Malvern, UK). The average particle size distribution was measured from six replicates of each sample. Suspensions were diluted with purified water. Data were evaluated using the volume distribution method, and characterization parameters were D10, D50, and D90 (i.e., D90 of 1  $\mu\text{m}$  means that 90% of volume of particles have a diameter of 1  $\mu\text{m}$  or less). To evaluate the changes in the PSD of the suspensions, samples stored at room temperature (25 °C) were measured at days 0 and 60.

### Prediction of Long-Term Physical Stability of the Suspensions

Technology based on the analysis of multiple light scattering was used to predict the long-term physical stability of suspensions. Turbiscan Lab (Formulation Co., L'Union, France) is an optical instrument that characterizes concentrated emulsions and dispersions. The analyzed suspension is placed on a cylindrical glass measuring cell. The light source is pulsed near infrared ( $\lambda = 880$  nm). Two synchronous optical sensors receive light transmitted through the sample (0° from the incident radiation, transmission [T] sensor) and light backscattered by the sample (135° from the incident radiation, backscattering [BS] detector). The principle of this measurement is based on variation in the particle volume fraction (migration) or mean size (coalescence), which results in variations in the BS and T signals (27–29). Therefore, this technique was used to detect changes in the location of particles in the suspensions. Measurements were performed at 25 °C.

## Chemical Stability

### pH Measurements

The pH values ( $n = 3$ ) were measured by immersing the probe directly into the sample using a digital pH/mV meter (Micro-pH 200, Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). The pH was measured at three temperatures at selected times (0, 7, 15, 30, and 60 days). A significant variance in pH over an adequate value per formula could indicate degradation of the pharmaceutical compounding or erroneous preparation.

### Suspension Uniformity and Spironolactone Stability

Homogeneity of the suspensions was examined at  $t = 0$  to ensure that every vial contained not less than 90% and no more than 110% of the theoretically calculated and labeled amount of spironolactone per unit volume. Six samples were taken from each vial, and spironolactone content was assayed using the high performance liquid chromatography (HPLC) method described below. Relative standard deviation (%RSD) was used to assess the homogeneity of the suspensions.

To evaluate the stability of spironolactone in the suspensions stored at the three temperatures, an analysis ( $n = 6$ ) was carried out during the storage period (at 0, 7, 15, 30, and 60 days) using the HPLC quantification technique described below. Preparations were considered



stable if the active substance was within  $\pm 10\%$  of the original amount.

To carry out the analysis, 250  $\mu\text{L}$  of suspension equivalent to 1.25 mg of spironolactone was diluted with 100 mL of methanol/water (30:70) in an amber glass flask to obtain a final spironolactone concentration of 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The solution was sonicated for 1 min in an ultrasonic bath (P-selecta 514, Vidrafoc, Barcelona, Spain) and then spotted and analyzed for spironolactone content.

#### Apparatus and Conditions

The HPLC system consisted of a Waters 717 Plus autosampler (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an Atlantis dC18 column (4.6  $\times$  150 mm, 5- $\mu\text{m}$ ) and a UV-vis detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 242 nm. The mobile phase was methanol/water (37:63) delivered at a flow rate of 0.8 mL/min. It was filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane and degassed by sonication prior to use. The injection volume was 50  $\mu\text{L}$ .

To assess the presence of canrenone, the main degradation product of spironolactone (30), a preliminary comparative study at 242 and 280 nm was carried out on a sample stored at 70  $^{\circ}\text{C}$  for 15 days under the conditions mentioned above.

#### Analytical Validation Calibration Standards

Calibration curves containing six standards from 25 to 0.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, and 0.78  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were prepared by making dilutions with appropriate volumes of methanol/water (30:70).

The methodology was validated according to International Conference on Harmonization guidelines Q2 (R1) (31, 32) and included an evaluation of the following characteristics: linearity, sensitivity, precision, accuracy, and limits of detection and quantification.

Calibration curves were validated interday ( $n = 6$ ). A linear regression analysis was performed. Furthermore, linearity was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) test of response factors (ratio of peak areas versus nominal concentrations of each standard), and differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

The selectivity of the assays was checked by individual analysis of blank samples stored at the corresponding temperatures.

The determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) was based on the standard deviation of the response ( $SD$ ) and the slope of the calibration curve ( $S$ ) according to the following equations:

$$\text{LOD} = 3.3 (SD/S) \quad \text{and} \quad \text{LOQ} = 10 (SD/S)$$

Accuracy was evaluated by means of the relative error (%), and intermediate precision was expressed as the relative standard deviation (RSD) of replicates in percentage. The maximum acceptable levels were 10% in both cases.

#### Dissolution Test (In Vitro Drug Release Studies)

The test was performed according to *USP* <711> (33) using a paddle apparatus (Apparatus 2) SR8 PLUS (Hanson Research, Canada) at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 75 rpm. Tablets or the suspensions (equivalent to 25 mg of spironolactone) were held in different vessels (1000 mL). The suspension sample (5 mL) was taken using a syringe and quantitatively transferred to the vessel at the top of the dissolution medium. To calculate the exact weight of suspension added to the vessel, the syringe was weighed at three stages: empty, filled with the suspension, and after the sample was expelled into the dissolution vessel. Aliquots were removed from the vessel and replaced with fresh dissolution medium (0.1 N HCl containing 0.1% sodium lauryl sulfate) at predetermined time intervals. For rapidly dissolving products including suspensions, useful information may be obtained from earlier points (33), thus aliquots were removed at 2, 5, 8, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, and 60 min for the tablets and at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, and 60 min for the suspensions. Spironolactone content was analyzed by spectrofluorometry at 242 nm using an Amersham Biosciences Ultrospec 1100 Pro UV-vis spectrophotometer (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at room temperature.

The method for quantifying spironolactone was also validated following the procedure described above. In this case, the solvent for the preparation of standard solutions was the dissolution medium.

Three kinetic models (a one-phase exponential association, a two-phase association model, and Boltzmann sigmoid) were used to fit the experimental data from the drug release experiment:

One-phase exponential association

$$y = y_{max} (1 - e^{-kx})$$

Two-phase association model

$$y = y_{max1} (1 - e^{-k_1x}) + y_{max2} (1 - e^{-k_2x})$$

Boltzmann sigmoid

$$y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + \exp\left(\frac{V_{50} - X}{Slope}\right)}$$

A nonlinear regression was performed using Prism software, V. 3.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). In addition, Akaike's information criterion (AIC) was determined for each model, as it is an indicator of model suitability for a given data set (34). The smaller the value of AIC, the better the model fits the data.

In addition, some non-model parameters such as dissolution efficiency (DE) and mean dissolution time (MDT) were calculated from the in vitro release data. These parameters are very useful for comparing profiles types,

as an evaluation of the dissolution characteristics of the formulations is not conditioned by the goodness of the fit to a theoretical model of our data (35). The  $DE(\%)$  was calculated by means of the following equation:

$$DE(\%) = \frac{\dot{\gamma} \int_0^t M \times dt}{C_{100} \times t} \times 100$$

where the numerator represents the area under the dissolution curve up to a certain time  $t$ , and the denominator is the rectangular area between the total amount of drug released and the last experimental time point  $t$ . For the area under the dissolution curve ( $AUC$ ) calculation, a continuous plot of the evolution of released quantities across the whole of the experimental time was calculated. Afterwards, respective  $AUC$  values were calculated by means of a trapezoidal rule for the whole time values interval.

$MDT$  is defined as the mean residence time of a drug in the formulation. It is a useful parameter for characterizing drug release rate from a dosage form. It was calculated using the equation:

$$MDT = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{t}_i \times \Delta M_i}{M_{\infty}}$$

where  $i$  is the sample number,  $n$  is the number of dissolution sample times,  $\bar{t}_i$  is the time at the midpoint between  $t_i$  and  $t_{i-1}$  calculated with the expression  $(t_i + t_{i-1})/2$ ,  $\Delta M_i$  is the increase in the amount of drug released at each time interval, and  $M_{\infty}$  is the asymptote of the dissolved amount of drug.

### Microbiological Stability

A microbiological test of the suspension that had the best characteristics was performed according to the *European Pharmacopoeia* monograph, *Microbiological examination of non-sterile products* (30). The microbial count is the average number of colony forming units (cfu) found in agar. Oral solutions meet microbial requirements if the total aerobic microbial count is below  $10^2$  cfu/mL, the total combined yeast/mold count is below  $10^1$  cfu/mL, and the absence of *Escherichia coli* is confirmed.

### Statistical Analysis

Data were statistically analyzed by the Student's  $t$ -test or one-way ANOVA for comparisons of three or more groups of data. The level of significance was set at  $p < 0.05$  using Prism V.3 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The preparation of extemporaneous formulations often involves the use of commercial dosage forms and their conversion into something patients can easily swallow

(36). However, the use of an API from the modification of a commercially available tablet or capsule could have legal and clinical implications (17). Therefore, pure powder was used to prepare the solutions. Glycerin was used to decrease the interfacial tension between the drug as a solid and the rest of the liquid, as spironolactone is practically insoluble in water. In SpIII, a suspending agent (carboxymethylcellulose) was chosen to increase viscosity and keep the suspended solid homogeneously distributed inside the formulation for longer. A concentration of 0.2% (w/v) was enough for this purpose. Excipient Acofar for Syrups and Excipient Acofar for Suspensions, used in SpIV, are commercially available in some European countries and are useful to pharmacists in the preparation of formulations.

### Physical Stability

All the formulations were redispersible suspensions. SpI, SpII, and SpIII were white, whereas SpIV was slightly pink with a characteristic fruity odor at  $t_0$ . There were no detectable changes in color and odor in any sample during the two months of storage at the three controlled temperatures.

Oral viscosity plays an important role in the perception of the texture of liquid or fluid pharmaceuticals. Several instrumental measurements have been described to correlate closely with perceived viscosity and therefore describe the thickness signal interpreted by the brain. For example, oral shear stress is calculated from the assumption that the mouth is comparable to parallel plate geometry on a rheometer (37). Viscosity measurements were made with an imposed shear rate ( $\dot{\gamma}$ ), and the resulting shear stress ( $\tau$ ) was measured. This type of test can be used to determine if the material is characterized by linear-viscous (Newtonian) behavior (shear-stress exponent  $n = 1$ ) in the investigated shear rate range or if it shows power-law behavior ( $n \neq 1$ ). The potential dependence of the viscosity of the solutions on the shear rate is shown in Figure 1.

The curves for SpI and SpII show constant viscosity values with an increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ , and thus the behavior was Newtonian. In both cases, the slope of the flow curve is constant, and the graph of viscosity is a line (38, 39). The curves for SpIII and SpIV are slightly dependent on shear rate, showing a consistent, although relatively small, decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ . This is the typical behavior of pseudoplastic fluids. In all cases, the hysteresis loop is inappreciable, which indicates that SpIII and SpIV did not show thixotropy.

Viscosity values at  $100 \text{ s}^{-1}$  were 0.110, 0.130, 0.450, and 0.030 Pa·s for SpI, SpII, SpIII and SpIV, respectively, at  $t_0$ . As shown in Table 2, no statistically significant differences were observed at  $t_{60}$  for the samples of all the suspensions stored at 4 and  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . A small decrease in the viscosity of SpIII and SpIV was observed ( $p < 0.05$ ) at  $t_{60}$  in the samples

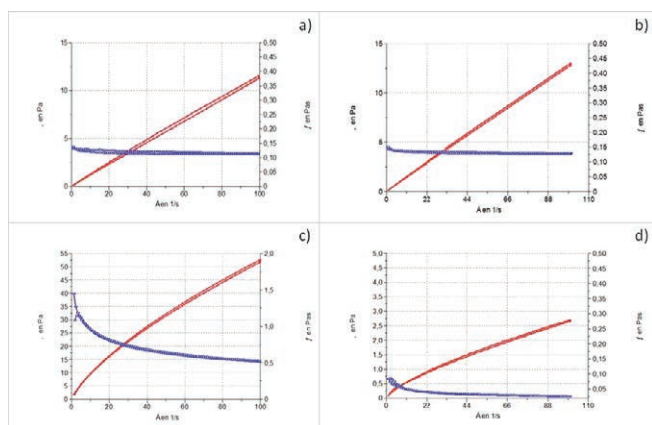


Figure 1. Rheograms of Suspensions (a) I, (b) II, (c) III, and (d) IV. The red line is shear stress (Pa), and the blue line is viscosity (Pa-s).

stored at 40 °C. This is the normal behavior of CMC solutions (40). Rheological stability is an important requirement, because the dosage process should ensure uniform distribution of the active substance within the suspension, especially among pediatric patients.

The suspensions that contained simple syrup had higher viscosity values than SpIV due to the higher concentration of sucrose. SpIII had the highest viscosity value, probably due to the mixture of carboxymethylcellulose and simple syrup (40). Glycerin did not influence viscosity, as Spl and SpII had similar viscosity values.

For SpIII and SpIV (pseudoplastic), Ostwald–de Waele, Carreau–Yasuda, Cross, and Herschel–Bulkley mathematical models were fitted to the data of the flow curve to identify the model that provided the best overall match of the experimentally observed rheological data. The criterion for selecting the most appropriate model was based on finding the best fit, with the highest correlation coefficient of the linear regressions ( $r$ ) and the lowest  $\chi^2$  value. Such a model provided the best statistical description of the rheological behavior. The model that best fit the experimental data in all cases was Cross, probably due to the presence of CMC (41). The accompanying results of the Cross model constants are listed in Table 3. In both cases, the rate index  $n$  remains constant at the end of the study regardless of the temperature.

Physical characteristics, particularly the particle size of the drug substance, are very important for suspensions (42). The PSD in the finished drug product dosage form is a critical parameter that significantly affects the bioavailability and pharmacokinetics of the product (43). Particle size was determined by LD at day 0 (just after the preparation of the suspensions) and at the end of the study ( $t_{60}$ ).

All of the suspensions were coarse dispersions (as classified by Ostwald), since the particle size was greater than 1  $\mu\text{m}$ . Particles in suspension have a surface free energy that makes the system unstable. The free energy of the system depends on the total surface area and the interfacial tension between the liquid medium and the solid particles. Thus, to minimize the free energy, the system tends to decrease the surface area, which is achieved by the formation of agglomerates (43). This was the case for Spl, which was the suspension with the largest particle size. SpII, SpIII, and SpIV had smaller particle sizes, as the presence of a wetting agent helps to lower the liquid–air interfacial tension. This enables the solvent to penetrate into the loose agglomerates of powder and thus displace the air from the pores of the individual particles (43). The results (Table 4) show that the distribution was consistent for Spl over the 60-day period, as both D10% and D90% were stable after 60 days. A very slight increase in PSD by day 60 in comparison with the values obtained at  $t_0$  was observed for SpII, SpIII, and SpIV.

Turbiscan Lab, an optical analyzer, was also used to detect destabilization phenomena. In comparison with classical stability measurements, this technique assesses physical stability without diluting or modifying the formulation (29). To assess the optical stability, Turbiscan Lab scans at various preprogrammed times and overlays the profiles on one graph to show the destabilization. Migration phenomena are displayed by local variations of backscattering (Figure 2). Backscattering fluxes are shown on the ordinate, and the height of the cell on the abscissa. The first profile is displayed in pink, and the last one in red. As expected, all of the suspensions were unstable systems. In SpIV, the backscattering level dropped at the top (right side of the spectrum) due to a decrease in the concentration of particles. Hence, the suspension clarified in this area. At the bottom of the suspension, there was an increase in particle concentration because of sediment

Table 2. Suspension Viscosity (Pa-s) at  $t_{60}$  at 4, 25, and 40 °C

Suspension	Temperature		
	4 °C	25 °C	40 °C
Spl	$0.108 \pm 3.4 \times 10^{-3}$	$0.107 \pm 3.1 \times 10^{-3}$	$0.106 \pm 4.3 \times 10^{-3}$
SpII	$0.123 \pm 2.9 \times 10^{-3}$	$0.120 \pm 4.7 \times 10^{-3}$	$0.106 \pm 4.3 \times 10^{-3}$
SpIII	$0.453 \pm 3.0 \times 10^{-3}$	$0.445 \pm 3.6 \times 10^{-3}$	$0.408 \pm 1.1 \times 10^{-3}$ (*)
SpIV	$0.453 \pm 3.0 \times 10^{-3}$	$0.031 \pm 9.4 \times 10^{-4}$	$0.022 \pm 7.9 \times 10^{-4}$ (*)

\* Statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) regarding  $t = 0$ .

**Table 3. Fitted Parameters for Effect of Temperature and Time on Flow Behavior of SpIII and SpIV**

Time/Temperature	Formulation	Parameter					
		$\eta_0$	$\eta_{\infty}$	$\gamma_0$	$n$	Chi <sup>2</sup>	$r$
$t_0$ (25 °C)	Suspension III	1.706	0.226	12.090	0.625	0.442	1
	Suspension IV	0.186	0.014	1.217	0.516	0.003	1
$t_{60}$ (4 °C)	Suspension III	1.268	0.202	14.570	0.645	0.686	1
	Suspension IV	0.249	0.015	0.513	0.539	0.001	1
$t_{60}$ (25 °C)	Suspension III	0.752	0.103	96.66	0.565	0.079	1
	Suspension IV	0.181	0.015	0.777	0.538	0.005	1
$t_{60}$ (40 °C)	Suspension III	0.727	0.180	51.340	0.703	0.034	1
	Suspension IV	0.106	0.014	2.717	0.691	0.002	1

**Table 4. Particle Size Distribution of the Suspensions at  $t_0$  and  $t_{60}$**

	Particle size ( $\mu\text{m}$ )					
	$t_0$			$t_{60}$		
	d10%	d50%	d90%	d10%	d50%	d90%
SpI	16.2 ± 0.2	35.4 ± 0.8	73.7 ± 0.5	15.4 ± 0.5	28.4 ± 0.7	73.1 ± 0.9
SpII	6.6 ± 0.5	14.1 ± 0.8	27.9 ± 0.9	8.2 ± 0.8	16.3 ± 0.9	30.4 ± 0.8
SpIII	5.5 ± 0.2	12.7 ± 0.2	26.9 ± 0.6	9.1 ± 0.6	17.8 ± 0.9	33.1 ± 0.4
SpIV	8.8 ± 0.8	18.2 ± 0.9	33.3 ± 0.7	10.7 ± 0.4	21.3 ± 0.7	41.9 ± 0.9

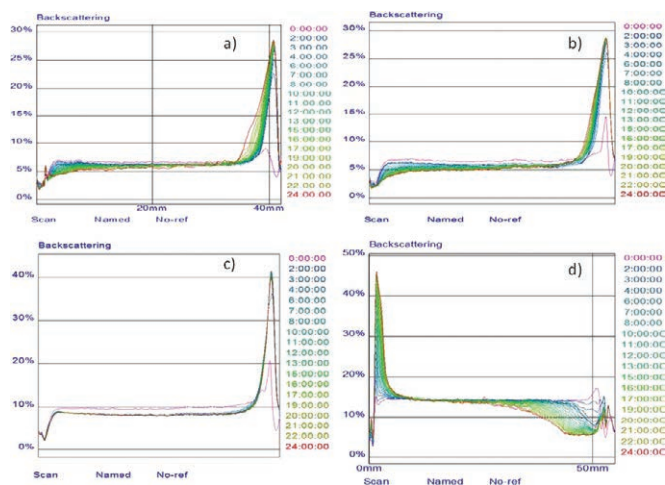


Figure 2. Backscattering profiles for suspensions (a) SpI, (b) SpII, (c) SpIII, and (d) SpIV.

formation. The presence of solvents and cosolvents (sorbitol, glycerin, PEG-40) in SpIV, together with suspending agents like carrageenan, which is a hydrophilic colloid that coats hydrophobic particles, and flocculating agents (calcium sulfate, sodium phosphate), helped the sedimentation of spironolactone, as shown in Figure 2. The presence of these ingredients in SpIV could also explain the second PSD obtained at day 60. Something different occurred for

SpI, SpII, and SpIII, in which the backscattering level decreased at the bottom (clarification) and increased at the top. This behavior could indicate that the chosen wetting agent, glycerin, was not enough to wet the particles of spironolactone, and thus flotation was observed. Destabilization was slower for SpIV than for the other suspensions. This characteristic is desirable, as it allows the formulation to remain homogenous longer. All the formulations were resuspendable, despite the occurrence of flotation or sedimentation. However, to achieve good redispersion of the particles and thus a homogeneous and correct dosage, sedimentation is more desirable than flotation.

### Chemical Stability

The pH of SpIV was around 4.5, which is the optimum pH of spironolactone as reported in the literature (44). SpI, SpII, and SpIII had pH values of around 6.5, probably due to the presence of potassium sorbate from the simple syrup (1), which does not contain any other acidic substances. In all cases, the measured pH remained fairly constant after two months of study (Table 5). As reported by other authors (1), the pH was not affected by temperature in any of the formulations. The above-optimum pH for spironolactone that was observed in SpI, SpII, and SpIII did not affect the amount of active ingredient present in the different formulations.

No peaks attributable to canrenone were detected after a preliminary comparative study carried out at 242

and 280 nm. Thus, spironolactone was assayed during the stability study under the specified conditions at 242 nm (the maximum wavelength of absorbance for spironolactone). The HPLC method for the quantification of spironolactone in the suspensions was linear, precise, and accurate in the concentration range of 25–0.78 µg/mL. LOD and LOQ are  $0.22 \pm 0.26$  µg/mL and  $0.68 \pm 0.79$  µg/mL, respectively, which confirm the sensitivity of the method. The accuracy values reported in Table 6 are within acceptable limits (<10%). The small percentage differences between the nominal and found concentrations of the standards show that the assay is accurate enough for its application. The between-day precision results are also depicted in Table 6, and the RSD values are less than 10% at all concentrations. These data clearly indicate that the assay method is reproducible between days.

The method was selective under the aforementioned chromatographic conditions, as the excipient peaks did not interfere with the spironolactone peak, which did not change and remained at the same retention time (about 12.0 min) throughout the study (Figure 3).

Regarding the uniformity of the suspensions, the mean recovery (%) for all of them was within the acceptable interval  $\pm 10\%$  of the labeled amount, as shown in Table 7. SpIII showed the lowest percent recovery and the highest RSD (%), probably due to its higher viscosity that allows the particles to remain in suspension longer, but also makes redispersion more difficult.

The analytical results show that the spironolactone content of all suspensions remained above 90% (w/v) of the original amount throughout the 60-day study, regardless of temperature. There were no statistically significant differences in the content of spironolactone for Spl, SpII, and SplV between  $t_0$  and  $t_{60}$ . However, as shown in Figure 4 and in line with the mean recovery (%) results, SpIII registered statistically significant variability ( $p < 0.05$ ) in spironolactone content at 4 and 25 °C. This variability was probably due to the higher viscosity at these temperatures, which could hinder sampling and the homogeneous distribution of spironolactone in the suspension. Higher temperatures decreased the viscosity of the formula, which facilitated sampling and homogeneity, and thus at 40 °C the results were more constant. Therefore,

**Table 5. Suspension pH Values (Median) at Different Times and Temperatures**

Formulation	Temperature (°C)	Time (Days)				
		0	7	15	30	60
Suspension I	4	-	$6.9 \pm 0.03$	$6.6 \pm 0.03$	$6.5 \pm 0.70$	$6.3 \pm 0.20$
	25	$6.5 \pm 0.03$	$7.0 \pm 0.04$	$6.6 \pm 0.02$	$6.2 \pm 0.30$	$6.0 \pm 0.30$
	40	-	$6.7 \pm 0.02$	$6.5 \pm 0.01$	$6.1 \pm 0.40$	$6.0 \pm 0.30$
Suspension II	4	-	$6.9 \pm 0.02$	$6.9 \pm 0.03$	$6.7 \pm 0.20$	$6.1 \pm 0.10$
	25	$6.6 \pm 0.1$	$6.9 \pm 0.02$	$6.8 \pm 0.02$	$6.8 \pm 0.20$	$6.2 \pm 0.20$
	40	-	$6.7 \pm 0.03$	$6.7 \pm 0.01$	$6.5 \pm 0.10$	$6.4 \pm 0.20$
Suspension III	4	-	$6.5 \pm 0.02$	$6.5 \pm 0.03$	$6.5 \pm 0.03$	$6.0 \pm 0.10$
	25	$6.4 \pm 0.30$	$6.6 \pm 0.06$	$6.5 \pm 0.03$	$6.5 \pm 0.01$	$6.0 \pm 0.10$
	40	-	$6.6 \pm 0.03$	$6.4 \pm 0.07$	$6.2 \pm 0.01$	$6.1 \pm 0.07$
Suspension IV	4	-	$4.3 \pm 0.08$	$4.2 \pm 0.03$	$4.2 \pm 0.06$	$4.1 \pm 0.01$
	25	$4.2 \pm 0.01$	$4.2 \pm 0.01$	$4.1 \pm 0.01$	$4.2 \pm 0.01$	$4.1 \pm 0.01$
	40	-	$4.2 \pm 0.02$	$4.2 \pm 0.05$	$4.2 \pm 0.02$	$4.2 \pm 0.01$

**Table 6. Accuracy and Precision Parameters for Spironolactone Quantification**

Concentration (µg/mL)	Average	Standard Deviation	Relative Error (%)	Relative Standard Deviation (%)
50	50.01	0.104	-0.035	0.208
25	25.00	0.223	-0.001	0.894
12.5	12.40	0.385	0.777	3.101
6.25	6.28	0.098	-0.490	1.429
3.125	3.16	0.077	-1.083	2.193
1.56	1.57	0.045	-0.947	2.882
0.78	0.79	0.074	-0.824	9.454

**Table 7. Recovery (%) of the Suspensions**

Formulation	Drug content (mg)	Found (mg)	% Mean Recovery (n = 6)	Relative Standard Deviation (%)
Suspension I	500	499.36	99.87	3.06
Suspension II	500	502.27	100.45	4.73
Suspension III	500	485.58	97.11	9.28
Suspension IV	500	496.92	99.38	1.34

based on the results, spironolactone was stable in all the studied formulations for 60 days at 4, 25, and 40 °C.

### Dissolution Test

Dissolution studies have great significance because, in most cases, drug dissolution is the rate-limiting step in the absorption process. As occurs with solid oral dosage forms, heterogeneous disperse systems (suspensions) could also have some problems with in vitro dissolution (45).

The dissolution test of the suspensions was performed and the results were compared with the dissolution profiles of the commercially available tablets (25 mg of spironolactone).

In vitro dissolution has been recognized as an important element in drug development, and under certain conditions, it can be used as a potential surrogate marker of bioequivalence (46, 47).

This comparative study has not yet been reported in the literature, but it is very important, as the composition of the suspensions could modify the dissolution time and affect the velocity of absorption of the active substance. The UV spectrophotometric method used to quantify spironolactone in the dissolution test was linear,

accurate, and precise over a range of concentrations from 1.56 to 25 µg/mL. The LOD and LOQ were  $0.19 \pm 0.16$  µg/mL and  $0.60 \pm 0.50$  µg/mL, respectively. Accuracy values (%RE) were less than 6.06% and thus within acceptable limits (<10%). The small percentage difference between the nominal and found concentration of the standards show that the assay is accurate enough for its application. Results for between-day precision (%RSD), ranging from 0.30 to 6.30%, clearly indicate that the assay method was reproducible between days.

The in vitro drug release test revealed that SpI, SpII, and SpIV dissolved almost immediately. However, this was not the case for SpIII, which took around 10 min to achieve the maximum concentration of active substance. The delay in the release of spironolactone in SpIII could be due to the presence of CMC together with simple syrup. Thus, the presence of these excipients could lead in variations in the velocity of spironolactone absorption.

The dissolution profiles of SpIII and the marketed tablets were compared. Parameters that were independent of the release model, such as *DE* and *MDT*, were calculated with the experimental values ( $n = 6$ ) for both formulations. The results are shown in Table 8. As expected, *MDT* was higher and *DE* was lower for the tablets than for the suspension.

A criterion for selecting the most appropriate drug release model was based on the best fitting model, which had the lowest value of *AIC* and the highest correlation

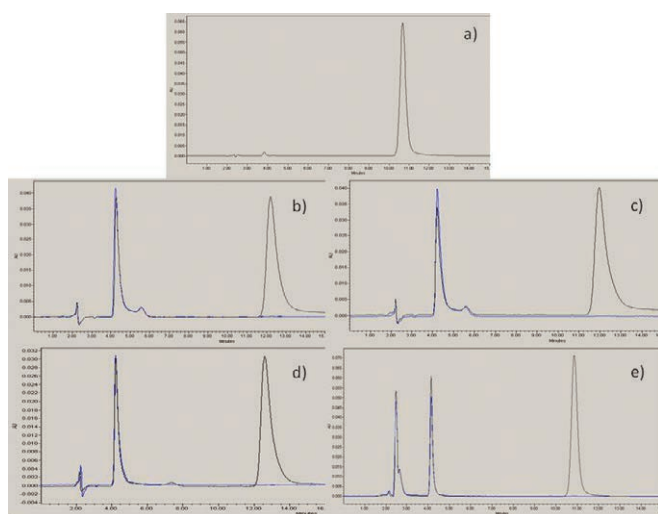


Figure 3. Chromatographic profiles of the (a) spironolactone standard; superposed chromatograms of blank (blue line) and sample (black line) for suspensions (b) SpI, (c) SpII, (d) SpIII, and (e) SpIV.

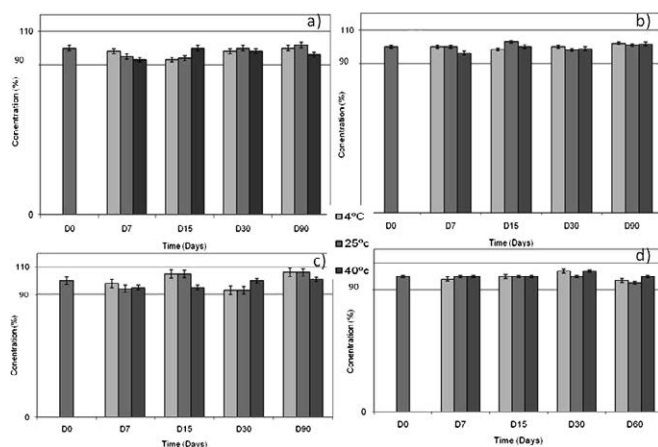


Figure 4. Stability of spironolactone in the suspensions over 60 days for suspensions (a) SpI, (b) SpII, (c) SpIII, and (d) SpIV.

coefficient of the linear regression ( $r^2$ ) and thus statistically described the best drug release mechanism. For SpIII, the model that best fit the data was the Boltzmann sigmoid. In general, the Boltzmann model is used to simulate the transport and reaction of fluids in porous media (48). In this case, the polymer (CMC) probably performs a function similar to porous matrices and, therefore, presents the same model. Other authors (49) used a coupled multi-phase lattice Boltzmann model to simulate the dissolution of immiscible liquid droplets in another liquid during the rising process resulting from buoyancy. However, for the tablets, a two-phase exponential association model fit the data best. This model is used when the measured outcome is the result of the sum of a fast and slow exponential decay. In our case, this could be due to the quick dissolution of the film coat of the tablets at the beginning and a subsequent slow disintegration due to the excipients (calcium sulfate or cornstarch) that limits the dissolution process.

Best-fit and goodness-of-fit values for both models are reported in Table 9. The mean dissolution profiles ( $n = 6$ ) for SpIII and for the tablet are shown in Figure 5.

### Microbiological Stability

Microbial contamination in nonsterile liquid formulations may cause a foul odor, turbidity, and adversely affect palatability and appearance. Otherwise, a high level of microorganisms may be hazardous to health, especially in immunocompromised patients.

**Table 8. Dissolution Parameters Independent of the Model**

Formulation	MDT (min)	AUC (mg min)	DE (%)
Tablet	10.2	1317.8	82.9
Suspension III	4.8	1403.0	91.8

AUC: area under the curve; MDT: mean dissolution profile; DE: Dissolution Efficiency.

**Table 9. Best-Fit Values and Goodness of Fit for Boltzman Sigmoid (Suspension) and Two-Phase Exponential Association (Tablets)**

Best-Fit Values for Suspension III		Goodness of Fit (Boltzman sigmoid)	
Bottom	2.33 mg	Degrees of Freedom	10
Top	25.61 mg	R <sup>2</sup>	0.9967
V50	5.16 min	Absolute sum of squares	2.481
Slope	1.61 min	Sy.x	0.4981
Best-Fit Values for Tablets		Goodness of Fit (Two-phase exponential)	
YMAX1	-5.20 mg	Degrees of Freedom	7
K1	0.62 min <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	0.9999
YMAX2	31.18 mg	Absolute sum of squares	0.08646
K2	0.12 min <sup>-1</sup>	Sy.x	0.1111
Half-life_1	1.10 min		
Half-life_2	5.76 min		

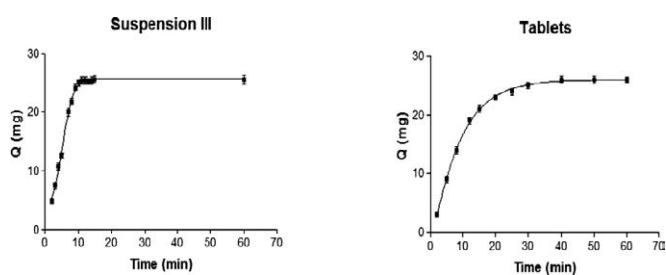


Figure 5. Dissolution profiles of SpIII and the marketed tablets.

Taking into account all the studied parameters, the microbiological test of SpIV was performed. No *E. Coli* contamination was observed, the total bacteria count was below 10<sup>2</sup> cfu/g, and the fungal contamination was below 10<sup>1</sup> cfu/g at day 60 of the study. These results indicate that SpIV complied with the *European Pharmacopoeia* specifications on the microbial examination of non-sterile product at 60 days.

### CONCLUSIONS

Four alcohol-free extemporaneous suspensions containing 5 mg/mL of spironolactone were prepared from drug powder. In general, the spironolactone extemporaneous formulation was kept as simple as possible, using simple syrup as the only selected vehicle. However, this suspension had the largest particle size, and flotation occurred. Glycerin, used as a wetting agent, was not enough to wet the particles in SpII and SpIII. The results suggest that SpIII was the least suitable due to its high viscosity, which made it difficult to achieve homogeneous redispersion. An accurate dosage is always very important, especially in the pediatric population. Furthermore, drug release in SpIII was slower than in the other formulations, which indicates that the presence of some excipients could have an influence on the dissolution profile of the suspensions. Only

SpIV had an optimum pH and the best physical stability. SpIV was also microbiologically stable for at least 60 days.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. L. Halbaut for technical support in the rheological studies, Dr. Gonzalez for her technical support in interpreting optical stability spectra, Language Services from the University of Barcelona for the correction of the paper, and the Permanent Commission for Uniform Compounding Pediatric Criteria for their help.

## REFERENCES

1. Salgado, A. C.; Rosa, M. L.; Duarte, M. A.; Almeida, A. J. Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations. *Eur. J. Hosp. Pharm. Sci.* **2005**, *11* (3), 68–73.
2. Walker, R. D.; Cumming, G. R. Response of the Infant Kidney to Diuretic Drugs. *Can. Med. Assoc. J.* **1964**, *91* (22), 1149–1153.
3. Noerr, B. Spironolactone. *Neonatal Netw.* **1999**, *18* (3), 43–46. DOI: 10.1891/0730-0832.18.3.43.
4. Hobbins, S. M.; Fowler, R. S.; Rowe, R. D.; Korey, A. G. Spironolactone Therapy in Infants with Congestive Heart Failure Secondary to Congenital Heart Disease. *Arch. Dis. Child.* **1981**, *56*, 934–938. DOI: 10.1136/adsc.56.12.934.
5. Buck, M. L. Clinical Experience with Spironolactone in Pediatrics. *Ann. Pharmacother.* **2005**, *39* (5), 823–828. DOI: 10.1345/aph.1E618.
6. Kao, L. C.; Warburton, D.; Cheng, M. H.; Cedeño, C.; Platzker, A. C.; Keens, T. G. Effect of oral diuretics on pulmonary mechanics in infants with chronic bronchopulmonary dysplasia: results of a double-blind cross-over sequential trial. *Pediatrics* **1984**, *74*, 37–44.
7. Albersheim, S. G.; Solimano, A. J.; Sharma, A. K.; Smyth, J. A.; Rotschild, A.; Wood, B. J.; Sheps, S. B. Randomized, double-blind, controlled trial of long-term diuretic therapy for bronchopulmonary dysplasia. *J. Pediatr.* **1989**, *115* (4), 615–620. DOI: 10.1016/S0022-3476(89)80297-5.
8. Danks, D. M. Diuretic Therapy in Infants and Children. *J. Pediatr.* **1976**, *88* (4), 695–696. DOI: 10.1016/S0022-3476(76)80047-9.
9. Sabri, M.; Saps, M.; Peters, J. M. Pathophysiology and management of pediatric ascites. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2003**, *5* (3), 240–246. DOI: 10.1007/s11894-003-0026-6.
10. Glass, B. D.; Haywood, A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2006**, *9* (3), 398–426.
11. Saavedra, I.; Quiñones, L.; Saavedra, M.; Sasso, J.; León, J.; Roco, A. Farmacocinética de medicamentos de uso pediátrico, visión actual. *Rev. Chil. Pediatr.* **2008**, *79* (3), 249–258. DOI: 10.4067/S0370-41062008000300002.
12. Standing, J. F.; Tuleu, C. Paediatric formulations—Getting to the heart of the problem. *Int. J. Pharm.* **2005**, *300* (1–2), 56–66. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.05.006.
13. Costello, I.; Long, P. F.; Wong, I. C. K.; Tuleu, C.; Yeung, V. *Paediatric Drug Handling*; Pharmaceutical Press: London, 2007.
14. Thomson, S. A.; Tuleu, C.; Wong, I. C. K.; Keady, S.; Pitt, K. G.; Sutcliffe A. G. Minitablets: New Modality to Deliver Medicines to Preschool-Aged Children. *Pediatrics* **2009**, *123* (2), e235–e238. DOI: 10.1542/peds.2008-2059.
15. Viriyaroj, A.; Klapachan, S.; Phanpleewan, C.; Viriyaroj, V.; Sornchainthawatwong, C.; Wiranidchamong, C. Physicochemical and Microbiological stability of Phenytoin Sodium Extemporaneous Suspension. *Thai. Pharm. Health Sci. J.* **2009**, *4* (4), 463–470.
16. Allen, L. V. Dosage form design and development. *Clin. Ther.* **2008**, *30* (11), 2102–2111. DOI: 10.1016/j.clinthera.2008.11.015.
17. James, A. The legal and clinical implications of crushing tablet medication. *Nurs. Times* **2005**, *100* (50), 28–29.
18. Brion, F.; Nunn, A. J.; Rieutord, A. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. *Acta Paediatr.* **2003**, *92*, 486–490. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2003.tb00583.x.
19. Santoveña, A.; Hernández-Paiz, Z.; Fariña, J. B. Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (2), 360–364. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.11.034.
20. Das Gupta, V.; Gibbs, C. W.; Ghanekar, A. G. Stability of pediatric liquid dosage forms of ethacrynic acid, indomethacin, methyl dopate hydrochloride, prednisone and spironolactone. *Am. J. Hosp. Pharm.* **1978**, *35* (11), 1382–1385.
21. Mathur, L. K.; Wickman, A. Stability of extemporaneously compounded spironolactone suspensions. *Am. J. Hosp. Pharm.* **1989**, *46* (10), 2040–2042.
22. Prammar, Y.; Das Gupta, V.; Bethea C. Development of a stable oral liquid dosage form of spironolactone. *J. Clin. Pharm. Ther.* **1992**, *17* (4), 245–248. DOI: 10.1111/j.1365-2710.1992.tb01300.x.
23. Nahata, M. C.; Morosco, R. S.; Hipple, T. F. Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared suspension at two temperatures. *Ann. Pharmacother.* **1993**, *27* (10), 1198–1199.
24. Allen, L. V. Jr.; Ericson, M. A. 3rd. Stability of ketoconazole, metolazone, metronidazole, procainamide hydrochloride, and spironolactone in extemporaneously compounded oral liquids. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **1996**, *53* (17), 2073–2078.
25. Allen, L. V. Jr.; Ericson, M. A. 3rd. Stability of labetalol hydrochloride, metoprolol tartarate, verapamil hydrochloride, and spironolactone with hydrochlorothiazide



- in extemporaneously compounded oral liquids. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **1996**, *53*, 2304–2309.
26. Asiri, Y. A.; Bawazir, S. A.; Al-Hadiya, B. M.; Gubara, O. A.; Al-Khamis, K. I. Stability of extemporaneously prepared spironolactone suspensions in Saudi hospitals. *Saudi Pharm. J.* **2001**, *9* (2), 106–112.
  27. Celia, C.; Trapasso, E.; Cosco, D.; Paolino, D.; Fresta, M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf., B* **2009**, *72* (1), 155–160. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.03.007.
  28. Lemarchand, C.; Couvreur, P.; Vauthier, C.; Costantini, D.; Gref, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *Int. J. Pharm.* **2003**, *254* (1), 77–82. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00687-7.
  29. Gonzalez-Mira, E.; Egea, M. A.; Garcia, M. L.; Souto, E. B. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids Surf., B* **2010**, *81* (2), 412–421. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.029.
  30. *European Pharmacopoeia*, 7th ed.; European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, Council of Europe: Strasbourg, France, 2011.
  31. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1)*; ICH Harmonised Tripartite Guideline: Geneva, Switzerland, 2005. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf) (accessed Jan 8, 2014).
  32. Araújo, J.; Garcia, M. L.; Mallandrich, M.; Souto, E. B.; Calpena, A. C. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): in vitro and ex vivo studies. *Nanomedicine* **2012**, *8* (6), 1034–1041. DOI: 10.1016/j.nano.2011.10.015.
  33. *The United States Pharmacopeia and National Formulary USP 32–NF 27*; The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2009.
  34. Yamaoka, K.; Nakagawa, T.; Uno, T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1978**, *6* (2), 165–175. DOI: 10.1007/BF01117450.
  35. Sierra Villar, A. M.; Clares Naveros, B.; Calpena Campmany, A. C.; Aróztegui Trenchs, M.; Barbé Rocabert, C.; Halbaut Bellowa, L. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for enhanced dissolution of gemfibrozil. *Int. J. Pharm.* **2012**, *431* (1–2), 161–175. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.001.
  36. Nahata, M. C.; Allen, L. V. Extemporaneous drug formulations. *Clin. Ther.* **2008**, *30* (11), 2112–2119. DOI: 10.1016/j.clinthera.2008.11.020.
  37. Ferry, A.-L.; Hort, J.; Mitchell, J. R.; Cook, D. J.; Lagarrigue, S.; Valles Pamies, B. Viscosity and flavour perception: Why is starch different from hydrocolloids? *Food Hydrocolloids* **2006**, *20* (6), 855–862. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2005.08.008.
  38. Schellart, W. P. Rheology and density of glucose syrup and honey: Determining their suitability for usage in analogue and fluid dynamic models of geological processes. *J. Struct. Geol.* **2011**, *33* (6), 1079–1088. DOI: 10.1016/j.jsg.2011.03.013.
  39. Lee, C. H.; Moturi, V.; Lee, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J. Controlled Release* **2009**, *136* (2), 88–98. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.02.013.
  40. Cancela, M. A.; Álvarez, E.; Maceiras, R. Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. *J. Food. Eng.* **2005**, *71* (4), 419–424. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.10.043.
  41. Benchabane, A.; Bekkour, K. Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC) solutions. *Colloid Polym. Sci.* **2008**, *286* (10), 1173–1180. DOI: 10.1007/s00396-008-1882-2.
  42. *Oral Solutions and Suspensions (8/94)*; Guide to Inspections; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2009.
  43. *Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing*; Kulshreshtha, A. K., Singh, O. N., Wall, G. M., Eds.; Springer: New York, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-1087-5.
  44. Pramdar, Y.; Gupta, V. D. Preformulation studies of spironolactone: Effect of pH, two buffer species, ionic strength, and temperature on stability. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80* (6), 551–553. DOI: 10.1002/jps.2600800611.
  45. Gonzalez Vidal, N. L.; Zubata, P. D.; Simionato, L. D.; Pizzorno, M. T. Dissolution Stability Study of Cefadroxil Extemporaneous Suspensions. *Dissolution Technol.* **2008**, *15* (3), 29–36.
  46. Costa, P.; Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13* (2), 123–133. DOI: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
  47. Gowthamarajan, K.; Singh, S. K. Dissolution Testing for Poorly Soluble Drugs: A Continuing Perspective. *Dissolution Technol.* **2010**, *17* (3), 24–32.
  48. Kang, Q.; Zhang, D.; Chen, S.; He, X. Lattice Boltzmann simulation of chemical dissolution in porous media. *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2002**, *65* (3). DOI: 10.1103/PhysRevE.65.036318.
  49. Chen, C.; Zhang, D. Lattice Boltzmann simulation of the rise and dissolution of two-dimensional immiscible droplets. *Phys. Fluids* **2009**, *21* (10), 103301. DOI: 10.1063/1.3253385.50.

### **3. DEVELOPMENT OF A SPECTROFLUOROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF FUROSEMIDE IN ORAL SOLUTIONS FOR PAEDIATRIC USE.**

La furosemida (5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-[(2-furanylmethyl) amino] benzoic acid) es un potente agente diurético que induce una fuerte diuresis, seguida de una pérdida de sodio y cloruro potásico en la orina, al actuar sobre la rama gruesa ascendente del asa de Henle. Su dosis diaria habitual para adultos es de 20 a 80 mg, mientras que para uso pediátrico es de 1mg/kg hasta un máximo de 40 mg/día. Se utiliza comúnmente en el tratamiento de trastornos cardíacos y pulmonares en bebés prematuros y recién nacidos.

En general, la cromatografía líquida de alta resolución suele ser el método de elección para estudios de estabilidad, ya que tiene la capacidad de separar la sustancia activa de los posibles productos de degradación. Sin embargo, en algunos lugares, como hospitales, esta técnica es demasiado cara y consume mucho tiempo. Por lo tanto, para cubrir la necesidad de métodos de análisis más rápidos, más simples y más baratos y con un mejor rendimiento, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método analítico por espectrofluorimetría para la cuantificación de la furosemida en soluciones orales para uso pediátrico como parte de su caracterización y posterior estudio de estabilidad, basado en la fluorescencia nativa de la furosemida en medio ácido ( $\lambda_{\text{ex}} = 226 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 409 \text{ nm}$ ).



## Results and discussion

The characteristics of Trp fluorescence are sensitive to changes caused by alterations in peptide conformation and membrane association. Changes in the microenvironment of the Trp of the E1 (148-165) peptide upon binding to zwitterionic DMPC or to negatively charged DMPC/DMPG (3:2) lipid bilayers were monitored by measuring its Trp fluorescence. Modifications in Trp fluorescence intensity are commonly observed when peripheral proteins interact with membranes. Often, the emission intensity increases and the  $\lambda_{\text{max}}$  undergoes a blue shift when a Trp-containing protein moves from an aqueous solution to a membrane-bound state (3). Our goal was to evaluate whether changes in Trp fluorescence could provide direct evidence of peptide interaction with membranes. The maximal emission wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) of E1 (148-165) was 338 nm in buffer, thus indicating that the Trp is slightly exposed to the medium (4) maybe due to a folding of the peptide. Addition of DMPC/DMPG vesicles to E1 (148-165) shifted the  $\lambda_{\text{max}}$  to shorter wavelengths and increased the fluorescence intensity (Figure 1). Both effects suggest that the Trp residue is located in a less polar environment, showing interaction and partial penetration of the peptides into the hydrophobic tail of the bilayer without being completely buried. On the other hand, as described for other peptides, this effect could result from an extended lipid conformation of the contact sites together with the intercalation of the Trp residue into the bilayers (5). The partition isotherms (Figure 2) show that the peptide partitions strongly in DMPC/DMPG bilayers, being the mole fraction partition coefficient,  $K_x$ ,  $4.8 \times 10^4$ . On the other hand, addition of DMPC vesicles did change neither fluorescence intensity nor maximum emission wavelength thus indicating the importance of electrostatics in the interaction.

## Conclusions

The experimental data obtained in this work reinforce the hypothesis that the E1 (148-165) peptide could be an internal fusion peptide of GB virus C. Moreover, the known preference of Trp for the interfacial regions of membranes was assessed by Trp fluorescence assays that show the shifting of the  $\lambda_{\text{max}}$  of the Trp residue to shorter wavelengths in presence of anionic bilayers.

## Acknowledgements

This work was supported by project CTQ2009-13969-C02/01/BQU from the *Secretaría de Estado de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación, Dirección General de Programas y transferencia de conocimiento, Subdirección General de Proyectos de Investigación* (Spain). The authors are members of the consolidated research group recognised by the *Generalitat de Catalunya* "Peptides and Proteins: physicochemical studies" (2009SGR560).

## References

- Halasz R, Weiland O, Sallberg M, Scandinavian J. GB Virus C/ Hepatitis G Virus. *Infect Dis* 2001;33:572–80.
- Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983.
- Ladokhin AS, Jayasinghe S, White SH. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem* 2000;285:235–45.
- Wimley WC, White SH. Designing transmembrane  $\alpha$ -helices that insert spontaneously. *Biochem* 2000;39:4432–42.
- Zhao H, Sood R, Jutila A, Bose S, Fimland G, Nissen-Meyer J, et al. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes* 2006;1758:1461–74.

## Development of a spectrofluorometric method for the determination of furosemide in oral solutions for paediatric use

N. Provenza<sup>1</sup>, A. C. Calpena<sup>1</sup>, M. A. Egea<sup>2</sup>, M. Mallandrich<sup>1</sup>, M. L. García<sup>2</sup>, H. L. Alvarado<sup>1</sup>, B. Clares<sup>3</sup>

<sup>1</sup>University of Barcelona, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology

<sup>2</sup>University of Barcelona, Department of Physical Chemistry

<sup>3</sup>University of Granada, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology

**Keywords:** Furosemide, oral solution, paediatric, spectrofluorometry

Furosemide is a potent diuretic agent used in the treatment of cardiac and pulmonary disorders of children, infants and neonates. Due to the lack in the market of a correct pharmaceutical form for this population, it has been carried out the development and characterization of a pharmaceutical compounding (oral solutions) of Furosemide for paediatric use. For the quantification of the active substance, a spectrofluorometric method has been developed based on the native fluorescence of the furosemide in acidic medium ( $\lambda_{\text{Ex}} = 226$  nm and  $\lambda_{\text{Em}} = 409$  nm). This method is linear (ANOVA;  $p < 0.05$ ) between 0.78 and 0.024  $\mu\text{g/ml}$  and it allows the quantification of the active substance from  $0.07 \pm 0.01$   $\mu\text{g/ml}$ . It has been demonstrated also the selectivity of the method. The oral solution of Furosemide was also characterized by determining parameters like pH ( $\approx 9.50$ ) and the rheological behavior (pseudoplastic fluid).

## Introduction

Furosemide (5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-[(2-furanylmethyl) amino] benzoic acid) is a potent diuretic agent that induces a powerful diuresis, followed by the loss of sodium, potassium and chloride into the urine, by acting on the thick ascending limb of the loop of Henle (1). Its usual daily dose for adults is 20–80 mg, while for paediatric use ranges from 1 mg/kg up to a maximum of 40 mg daily. It is commonly used in the treatment of cardiac and pulmonary disorders in premature infants and neonates (2).

In our country, Furosemide is marketed only in tablets, solution for injection and/or solution for perfusion. Children are not small adults (3), there are a lot of pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between adults and infants. Only a few products have been designed and tested specifically for paediatric use. Therefore, taking into account the lack of correct pharmaceutical forms for paediatric use, an oral solution of Furosemide (pharmaceutical compounding) that would favour proper dose adjustment has been developed and characterized, determining parameters like pH, rheological behavior and concentration of active substance.

The aim of this work was to develop an analytical method by spectrofluorometry (4) for the quantification of Furosemide in oral solutions for paediatric use, as part of its characterization and posterior stability test, based on the native fluorescence of the molecule in acidic medium ( $\lambda_{\text{Ex}} = 226$  nm and  $\lambda_{\text{Em}} = 409$  nm). This technique is well known for its simplicity, low cost and frequency of analysis. It shows also a higher sensitivity and selectivity than other techniques like UV-Vis.

**Table 1.** Formula of the oral solution of Furosemide (pharmaceutical compounding)

Furosemide	0,2% (2 mg/ml)
Buffer carbonate/bicarbonate (pH = 9.8)	10%
Excipient Acofar without sugar	qs 100 ml

## Experimental

Selected formula is described in table 1. Rheological behavior was determined using a Haake RheoStress 1 and pH was measured using a Crisson pH-metre microPH 200. For the quantification of the active substance a spectrofluorimeter Shimadzu RF-1501 was used and standard curves from  $2.362 \times 10^{-3}$  M to  $7.35 \times 10^{-5}$  M were prepared with a buffer solution of KCl/HCl (pH = 2).

Data analysis was carried out using the software GraphPad Prism 3.

## Results and discussion

Selected method is linear (ANOVA;  $p < 0.05$ ) between 0.78 and  $0.024 \mu\text{g/ml}$  and the quantification limit was of  $0.07 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ .

The active substance present in the oral solution was quantified by spectrofluorometry, obtaining a concentration of Furosemide of  $2.12 \text{ mg/ml}$ , which is within the range of  $\pm 10\%$  established in the USP monograph for Oral Solution of Furosemide.

In the other hand, the fluorescence intensity of the mix of excipients presents in the oral solution has been determined being negligible or null.

Average pH value at the time of preparation was 9.50 which is within the range specified in the mentioned USP monograph. Selected formula resulted to be a pseudoplastic fluid with an apparent viscosity of  $36.60 + 8.772 \times 10^{-5} \text{ mPa}\cdot\text{s}$ .

In conclusion, it has been developed a simple and low cost method for the determination of furosemide in oral solutions suitable for pediatric use, getting quantify selectively the active substance concentrations above  $0.07 \mu\text{g/ml}$ .

## Acknowledgements

ACOFARMA, S.A. (Barcelona-Spain).

## References

- Giebisch G. The use of a diuretic agent as a probe to investigate site and mechanism of ion transport process. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1985;35:336–42.
- Agyralides GG, Dallas PP, Rekkas DM. Development and in vitro evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques. *International Journal of Pharmaceutics* 2004;281:1–2.
- Standing, Joseph F, Catherine Tuleu. *International Journal of Pharmaceutics* 2005;300:56–66.
- Buitrago A, Calderón L, León A, Brunetto R, Galignani M. Pediatric formulations –Getting to the heart of the problem. *Avances en Química* 2010;5:15–25.

## A photo-induced fluorescence method for determination of propanil herbicide residues in Senegal natural waters

O.M.A. Mbaye<sup>1,2</sup>, M. D. Gaye Seye<sup>1,2</sup>, J. J. Aaron<sup>1</sup>, A. Coly<sup>2</sup>, A. Tine<sup>2</sup>, M. A. Oturan<sup>1</sup>, N. Oturan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LGE, Université Paris-Est Marne-la-Vallée, 5 boulevard Descartes, Champs-sur-Marne, 77454 Marne-la-Vallée Cedex 2, France.

E-mail: jeanjacquesaaron@yahoo.fr

<sup>2</sup>Laboratoire de Photochimie et d'Analyse, Département de Chimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université C. A. Diop, Dakar, Sénégal.

**Keywords:** Pesticides; Propanil; Photo-induced fluorescence (PIF); Water analysis

## Introduction

Many pesticides, such as propanil, a post-emergence contact anilide herbicide, are extensively applied for protecting various crops in Senegal and other countries, resulting in the presence of pesticide residues in natural waters, with notable toxicological effects on

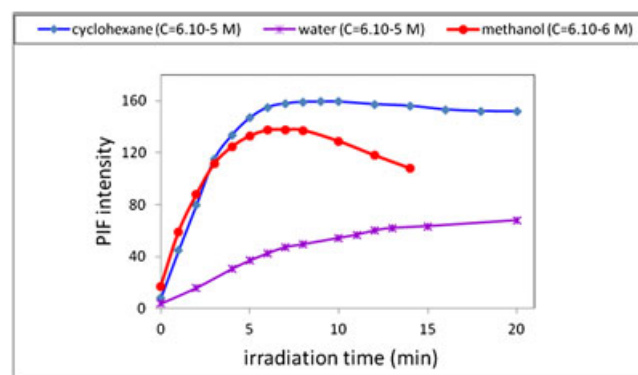
aquatic organisms. Also, propanil is degraded by micro-organisms in soils and aqueous media (1). Several analytical methods, mainly chromatographic ones, have been developed for the determination of propanil residues, together with other herbicides, in natural waters and other environmental samples (2–4).

In this paper, we present a simple photo-induced fluorescence (PIF) method in stationary solution for the determination of propanil in natural waters. This method is based on the photo-transformation of naturally non-fluorescent pesticides into fluorescent photoproduct(s) under UV irradiation (5, 6). First, the PIF method was optimized by studying the effect of solvent and irradiation time on the propanil PIF properties. Then, the analytical performances were obtained, and PIF was applied to determination of propanil in spiked natural waters from Senegal, using a liquid-liquid extraction technique.

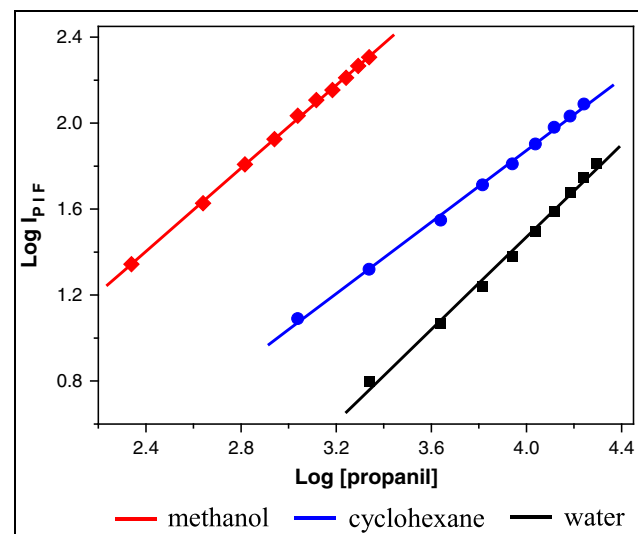
## Results and discussion

Photochemical reactivity and PIF spectral properties

We studied the evolution of the propanil PIF intensity vs. irradiation time in cyclohexane, methanol and water. The PIF signal initially



**Figure 1.** Effect of the UV irradiation time on the propanil PIF intensity in: a) cyclohexane ( $6 \times 10^{-5}$  M); b) methanol ( $6 \times 10^{-6}$  M); c) aqueous solution ( $6 \times 10^{-5}$  M).



**Figure 2.** Log-log calibration curves for the determination of propanil by the PIF method in the three media under study. The concentration units are in  $\text{ng/mL}$ .

#### **4. PERMEATION STUDIES THROUGH PORCINE SMALL INTESTINE OF FUROSEMIDE SOLUTIONS FOR PERSONALIZED PAEDIATRIC ADMINISTRATION.**

En este trabajo se desarrollaron dos fórmulas magistrales (soluciones orales) de furosemida (2 mg/ml) para uso pediátrico utilizando excipientes comerciales, una de ellas apta para la población diabética.

El objetivo de este estudio fue doble:

- Se determinó la estabilidad físico-química y microbiológica de las soluciones almacenadas a 4, 25 y 40 °C durante un período de 60 días. Las características organolépticas, el contenido de furosemida, el pH, así como el comportamiento reológico y la viscosidad, se evaluaron en los tiempos pre-fijados según el plan de trabajo.
  
- Por otro lado, se evaluó la influencia de los excipientes sobre la absorción de la furosemida en estas soluciones a través de intestino delgado de cerdo. Se determinó el perfil de absorción de la furosemida de cada solución. Los estudios de absorción han adquirido gran importancia ya que la presencia de determinados excipientes podría potenciar o disminuir la absorción de la furosemida a través del intestino. Este hecho es de especial relevancia en la población pediátrica que requiere un mayor ajuste de la dosis.





Personalised medicine

## Permeation studies through porcine small intestine of furosemide solutions for personalised paediatric administration

N. Provenza<sup>a</sup>, A.C. Calpena<sup>a</sup>, M. Mallandrich<sup>a</sup>, A. Sánchez<sup>a</sup>, M.A. Egea<sup>b</sup>, B. Clares<sup>c,\*</sup><sup>a</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Av. s/n, Barcelona 08028, Spain<sup>b</sup> Department of Physical Chemistry, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Av. s/n, Barcelona 08028, Spain<sup>c</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja St. s/n, Granada 18071, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 July 2014

Received in revised form 21 August 2014

Accepted 27 August 2014

Available online 29 August 2014

## Keywords:

Furosemide

Paediatric design

Oral solution

Intestinal permeation

## ABSTRACT

Personalized medicine is a challenging research area in paediatric drug design since no suitable pharmaceutical forms are currently available. Furosemide is an anthranilic acid derivative used in paediatric practice to treat cardiac and pulmonary disorders in premature infants and neonates. However, it is not commercialized in suitable dosage forms for paediatrics. Elaborating new paediatric formulations when no commercial forms are available is a common practice in pharmacy laboratories; amongst these, oral liquid formulations are the most common. We developed two extemporaneous paediatric oral solutions of furosemide (pure powder). The characterization and stability study were also performed. Parameters such as organoleptic characteristics, rheology, pH, content of active substance, and microbial stability were evaluated at three temperatures for two months. Evaluation of all these parameters showed that both solutions were stable for 60 days at 4 and 25 °C. Moreover, *ex vivo* studies were performed to evaluate the permeation behaviour of developed solutions through porcine small intestine to evaluate the potential paediatric biological parameters influencing the bioavailability and efficacy. A validated spectrofluorometric method was also used for this purpose. Our results guarantee a correct dosification, administration and potential efficacy of furosemide when is formulated in liquid oral forms for the treatment of cardiac and pulmonary disorders in children.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Furosemide (FUR) is an anthranilic acid derivative (Smith et al., 1980). It is commonly used as a high-ceiling or loop diuretic (Foye et al., 1995) showing a rapid onset of action and high efficacy (Brazy and Gunn, 1976). It acts on the ascending thick limb of the loop of Henle by inhibiting the co-transporter of sodium, potassium and chloride, and further causes the excretion of calcium, magnesium and bicarbonate ions (Giebisch, 1985). Furosemide is one of the most effective and least toxic diuretics used in paediatric practice to treat cardiac and pulmonary disorders in premature infants and neonates (Agryalides et al., 2004).

In some countries, FUR is only commercially available in tablets. The lack of oral liquid dosage forms on the market is an ongoing problem in many clinical settings. In this context, personalized medicine is a current and challenging research area. Paediatrics are more vulnerable to drug administration errors due to a lack of appropriate dosages forms and strengths for use

in this group of patients. Therefore, the community and hospital pharmacists are often challenged with the preparation of a dosage form not commercially available using traditional pharmaceutical compounding techniques as an alternative (Provenza et al., 2014; Santoveña et al., 2012). Only a few products have been designed and tested specifically for paediatric use (Winckler, 2002). Reported studies of medicines commonly prescribed for children with cardiovascular problems concluded that most medicines were unlicensed (Standing and Tuleu, 2005). Unfortunately, many children continue to be treated with unlicensed medicines or adult medicines used “off-label” (Waller, 2007). For this reason, in the design and formulation of dosage forms the physical, chemical and biological properties of the active substance, as well as, the rest of pharmaceutical ingredients used should be seriously considered (Nahata and Allen, 2008).

Orally administered liquids are still considered the standard forms for these patients (Bauters et al., 2012), because a single liquid paediatric preparation may be used for infants and children of all ages, with the dose of the drug varied by the volume administered reducing potential dosage mistakes, and helping the treatment adherence (Allen, 2008).

\* Corresponding author. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: [beatrizclares@ugr.es](mailto:beatrizclares@ugr.es) (B. Clares).



Available data on solubility, oral absorption and permeability are sufficiently conclusive to classify FUR as a class IV drug (low solubility, low permeability) according to the biopharmaceutics classification system (Granero et al., 2010). Due to its acidic nature ( $pK_a$  3.9) it is mostly absorbed in stomach and upper small intestine (Karkhile et al., 2010). Several *in vitro* approaches, based on cell cultures were used to estimate the human oral absorption of drugs, being the Caco-2 cell line the most widely employed (Jung et al., 2006). As clinical studies on paediatrics have a special regulation, in the present work, porcine small intestine was used to calculate the effective permeation ( $P_{eff}$ ) of FUR because of its similarity with the human small intestine (Sanderson and Walker, 1999).

Therefore, the main purpose of the present work was the design of paediatric oral formulations of FUR and the development of a simple and feasible standard operating procedure (SOP) for its use by pharmacist both in community and hospital facilities to guarantee the correct dose administering, the efficiency of the treatment and the formulation stability during its preparation and storage. As second aim, the physicochemical properties, microbiological stability and  $P_{eff}$  of apical to basolateral side were evaluated and compared with reported results using Caco-2 cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical and reagents

The active pharmaceutical ingredient (API) FUR, excipient for syrup (sucrose, water, sorbitol, glycerine, flavouring, citric acid, methylparaben, potassium sorbate, sodium phosphate, and colouring) and excipient for syrup sugar free (water, sorbitol, glycerin, flavouring, sodium saccharin, xanthan gum, citric acid, potassium sorbate, methylparaben, sodium citrate, propylparaben, and colouring) were pharmacopoeia grade and provided by Acofarma S.A. (Barcelona, Spain). All other chemicals were all of analytical grade (Sigma–Aldrich, Spain). Double distilled water was used after filtration in a Milli-Q<sup>®</sup> Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain).

### 2.2. General SOP

The development of age-appropriate paediatric formulations is paramount to enable child adherence to treatment. It encompasses multi-dimensional considerations including the administration route, the formulation technology, the dosage strength and other parameters such as organoleptic properties, viscosity or pH.

The preparation of extemporaneous formulations often involves commercial dosage forms modification to facilitate an oral administration as liquid forms (Nahata and Allen, 2008);

**Table 1**  
Components of formulations.

Ingredients	Solution I	Solution II
Furosemide (mg)	200	200
Buffer carbonate–bicarbonate (pH 10) (mL)	10	10
Excipient for syrup (mL)	q.s. 100	–
Excipient for syrup sugar free (mL)	–	q.s. 100

however, the use of the API by modifying a commercially available tablet or capsule could involve clinical and legal implications. Therefore, we used pure powder to prepare the solutions and commercially available excipients for facilitating the elaboration by pharmacists. Solution II is also suitable for the diabetic population as the excipient used is sugar-free.

Compositions of the developed formulations of FUR are reported in Table 1 and were elaborated according to the following SOP: 200 mg of FUR were added to 10 mL carbonate/bicarbonate buffer solution (pH 10) at room temperature (Budavari, 1989), and sonicated (>20 KHz) in an ultrasonic bath p-selecta 514 (Vidrafoc, Barcelona, Spain) for 5 min. Subsequently, the vehicle (excipient for syrup in solution I or excipient for syrup sugar free in solution II) was slowly added under stirring using a magnetic stirrer (700 rpm) until a complete solution was achieved. Blank samples were also elaborated in a similar way. All formulations were stored under the same conditions for further analysis.

### 2.3. Stability test

Further to the preparation of solutions, aliquots of 10 mL were stored in amber glass vials at three temperatures (4, 25 and 40 °C) for 2 months. Measures were performed at 0, 7, 15, 30 and 60 days. Analyses comprised the physicochemical testing of quantifiable parameters considered likely to change during storage, such as appearance, pH, rheological behaviour, microbial growth, and drug content. The acceptance limits established are shown in Table 2.

#### 2.3.1. Appearance

The physical appearance was studied via visual and olfactory examination of the samples stored at each temperature. Thus, parameters such as odour, colour or tendency to spontaneously form precipitates could be appreciated.

#### 2.3.2. pH measurements

pH values ( $n = 3$ ) were measured using a digital pH/mV-meter micro-pH 200 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain) at three temperatures and pre-selected times. A significant variance of pH over an adequate value per formula was considered to indicate degradation of the pharmaceutical compound or erroneous elaboration.

**Table 2**  
Acceptance limits.

Parameter	Acceptance limits	
Appearance (colour, odour, absence of particles in suspension)	Slightly orange (solution I). Pink (solution II), transparent and with characteristic odour (fruity)	
Furosemide content	±10% of the original amount	
pH	7–10	
Rheological behaviour	Complies (1–250 mPa s)	
Microbiological test <sup>a</sup>	TAMC (CFU/mL)	TYMC (CFU/mL)
	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>1</sup>
	Absence of <i>Escherichia coli</i>	

TAMC: total aerobic microbial count; TYMC: total yeast/mould count.

<sup>a</sup> European pharmacopoeia specifications for microbiological quality of non-sterile products for pharmaceutical use.

### 2.3.3. Rheological behaviour

Rheological characterization of the formulations was performed at 25 °C using a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with a parallel plate geometry set-up with a fixed lower plate and an upper plate (Haake PP60 Ti, 6 cm diameter). Different gaps between plates were tested and a separation of 0.5 mm was used. Viscosity and flow curves ( $n = 3$ ) were recorded for 3 min during the ramp-up period from 0 to 100 s<sup>-1</sup>, 1 min at 100 s<sup>-1</sup> (constant shear rate period) and finally 3 min during the ramp-down period from 100 to 0 s<sup>-1</sup>. The viscosity value at 100 s<sup>-1</sup> was also measured at pre-selected temperatures and times. Various mathematical models (Ostwald-De-Waele, Carreau-Yasuda, Cross, and Herschel-Bulkley) were used to fit the experimental data from the flow curve (when non-Newtonian).

### 2.3.4. Microbiological test

Microbiological tests of the stored solution samples (0 and 60 days) were performed following the European Pharmacopoeia monograph of non-sterile products (European Pharmacopoeia, 2014). The microbial count was considered to be the average number of colony forming units (CFU) found in agar. Oral solutions are considered to meet microbial requirements when the total aerobic microbial count is less than 10<sup>2</sup> CFU/mL, the total combined yeast/mould count is less than 10<sup>1</sup> CFU/mL and the absence of *Escherichia coli* is confirmed.

### 2.3.5. FUR content in the solutions

To assess the uniformity of FUR content in the solutions analysis of 10 mL samples ( $n = 6$ ) was carried out during the storage period using the quantification technique described below. After storage, preparations should contain no less than 90% and no more than 110% of the original amount of API (Salgado et al., 2005).

## 2.4. Intestine permeation studies

Ninety percent of the total absorption in the gastrointestinal tract occurs in the small intestine. *Ex vivo* studies were performed to evaluate the oral absorption of FUR when formulated as an oral solution. Due to the low bioavailability of FUR this study was necessary in order to check its possible efficacy.

This study was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation at the University of Barcelona. Tissues were obtained from the animal facility (University of Barcelona). 3–4-month-old female pigs ( $n = 3$ ) were sacrificed using an overdose of sodium thiopental anaesthesia. Porcine small intestines were surgically removed and transported to the laboratory in containers filled with Hank's liquid (Krackeler Scientific Inc. Albany, NY, USA) (Martín-Villena et al., 2013). In the laboratory, intestinal tissues were cut in pieces and mounted on vertical Franz diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA).

In order to simulate pH changes that FUR would suffer until reaching the small intestine lumen, solutions I and II were pre-treated before addressing the permeability study. Taking into account a 2–3 h period, children gastric pH of 3.18 ± 0.61, acid production of 0.40 ± 0.29 mL/Kg and a recommended paediatric FUR dose of 2 mg/kg (Dumont and Rudolph, 1994; Moyao-García et al., 2001), solutions I and II (15 mL supposing a 15 kg child) were diluted in 6 mL HCl 0.1 N and then pH adjusted to 7.6 with NaOH 0.1 N.

Each Franz diffusion cell had an effective diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup> and 12 mL receptor chamber capacity. The tissue membranes were mounted between the donor and receptor compartment with the apical side facing the donor compartment and the basolateral side facing the receptor medium, which was filled with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.6). This is a biocompatible medium that allows keeping sink conditions in

all the experiment. 0.3 mL samples ( $n = 6$ ) were applied to the donor compartment and sealed with Parafilm<sup>®</sup> immediately to prevent water evaporation. Temperature was kept at 37 °C by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at 700 rpm. Samples of 0.3 mL were withdrawn at regular time intervals for 3 h, and replaced with the same volume of buffer solution. FUR content was analysed as described below.  $P_{\text{eff}}$  was calculated using the following equation:

$$P_{\text{eff}} = \frac{b}{A \times C} \quad (1)$$

where  $b$  is the slope;  $A$  is the surface of small intestine (2.54 cm<sup>2</sup>) and  $C$  is the initial concentration.

## 2.5. Analytical quantification

Fluorometric measurements were performed on a fluorescence spectrophotometer Shimadzu RF-1501 (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) with an excitation wavelength of 229 nm and an emission wavelength of 409 nm. Calibration curves were prepared with a KCl/HCl buffer solution (0.2 M; pH 2). This technique is based on the native fluorescence of FUR in acidic pH (Wening and Breitkreutz, 2011). The developed methodology was validated following the International Conference on Harmonization Guidelines Q2 (R1) (ICH, 2006), including an evaluation of the linearity, sensitivity, accuracy and precision.

The linearity of the methods was evaluated by constructing the calibration curves at seven concentration levels 0.78, 0.62, 0.50, 0.39, 0.29, 0.195 and 0.097 µg/mL. The calibration curves were validated interday ( $n = 6$ ) by different analysts and developed by plotting the instrument measurements versus the corresponding drug concentrations. The least squares fit method was employed to statistically evaluate the results for linearity by a regression line and the corresponding slope,  $y$ -intercept and coefficient of linear correlation ( $r^2$ ). Furthermore, linearity was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) test to compare the ratio fluorescence signal versus nominal concentrations of each standard. Sensitivity was determined with respect to limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Both parameters, LOD and LOQ were determined based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curves. Accuracy was defined as the percentage of the relative error (RE), which is determined as standardized agreement between the measured value and the true value. Precision was determined by the intraday repeatability, for this, the relative standard deviation (RSD) of replicates analysed during the same day (while keeping the operating conditions identical) was calculated. Similarly, the intermediate precision (interday) was assessed by repeated analysis of the control samples in six different days.

A linear relationship between fluorescence intensity and FUR concentration was obtained in the range 0.78–0.097 µg/mL. Determination coefficients ( $r^2$ ) were >0.99 in all curves and no statistically significant differences were found ( $P = 0.48$ ). LOD was

**Table 3**  
Accuracy and precision parameters for furosemide quantification.

Standard (µg/mL)	Mean	SD	RSD%	RE%
0.097	0.10	0.00	4.08	0.68
0.195	0.21	0.02	7.99	5.71
0.29	0.29	0.02	6.26	1.24
0.39	0.40	0.02	5.32	2.45
0.5	0.53	0.02	3.77	5.00
0.62	0.61	0.01	2.42	-2.08
0.78	0.77	0.02	2.93	-1.86

**Table 4**  
Physicochemical properties of formulations. Mean pH and viscosity (mPa s) values ( $n=3 \pm SD$ ) of assayed formulations at different times and temperatures.

Temperature		4 °C		25 °C		40 °C	
Time (days)	Formulation	pH	Viscosity	pH	Viscosity	pH	Viscosity
0	Solution I	–	–	8.64 ± 0.01	23.98 ± 0.10	–	–
	Solution II	–	–	9.58 ± 0.01	40.70 ± 0.04	–	–
7	Solution I	8.62 ± 0.01	24.02 ± 0.09	8.67 ± 0.02	23.90 ± 0.09	8.59 ± 0.03	23.81 ± 0.10
	Solution II	9.58 ± 0.01	39.50 ± 0.10	9.53 ± 0.03	39.87 ± 0.10	9.44 ± 0.01	40.03 ± 0.09
15	Solution I	8.62 ± 0.03	23.15 ± 0.11	8.58 ± 0.03	23.88 ± 0.11	8.31 ± 0.03	23.75 ± 0.08
	Solution II	9.53 ± 0.01	39.89 ± 0.09	9.53 ± 0.01	39.95 ± 0.05	9.44 ± 0.01	39.84 ± 0.07
30	Solution I	8.65 ± 0.02	23.75 ± 0.10	8.55 ± 0.04	24.01 ± 0.09	8.29 ± 0.01	23.80 ± 0.11
	Solution II	9.53 ± 0.04	40.03 ± 0.02	9.48 ± 0.01	40.08 ± 0.08	9.32 ± 0.01	39.97 ± 0.08
60	Solution I	8.56 ± 0.01	23.69 ± 0.09	8.50 ± 0.15	23.95 ± 0.10	8.10 ± 0.02	23.68 ± 0.10
	Solution II	9.41 ± 0.02	39.33 ± 0.04	9.36 ± 0.01	40.58 ± 0.40	9.13 ± 0.03	39.13 ± 0.03

0.032 ± 0.01 µg/mL and LOQ 0.096 ± 0.01 µg/mL (3.3 and 10 confidence level, respectively).

The accuracy of the method is reported in Table 3 as RE(%), which ranged between 0.68 and 5.71% (absolute values). The small percentage of difference between nominal and found concentrations of the standards showed sufficient accuracy for this application. Precision in analysis expressed in % RSD values and ranged between 2.42 and 7.99%.

## 2.6. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD of at least three replicates. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out testing the differences between the mean values of different groups using Prism<sup>®</sup>, V. 3 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Results were considered to be significant if  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Stability and characterization

After preparation ( $t_0$ ), both oral solutions were transparent, slightly orange (solution I) and pink (solution II) with a characteristic fruity odour. The appearance remained constant at 4 °C and 25 °C for 60 days but the colour changed from day 7 at 40 °C in both cases, making them darker in colour (brownish hue). Similar behaviour was also observed in blank solutions suggesting that changes were caused by the excipient exposure to temperature and basic pH.

At  $t=0$ , pH values (25 °C) were 8.64 ± 0.01 for solution I and 9.58 ± 0.01 for solution II. In both cases, there was a downward trend in pH when the temperature increased. However, no

statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed in pH values throughout the study (Table 4). All registered values were within the acceptance pH interval 7–10 allowing the maintenance of FUR in solution (The United States Pharmacopeial Convention, 2007).

Viscosity values at 100 s<sup>-1</sup> were 23.98 ± 0.10 mPa s and 40.70 ± 0.04 mPa s for solutions I and II respectively at  $t_0$ .

No *E. coli* contamination was observed in both solutions, and the total bacteria count was less than 10<sup>2</sup> CFU/g at day 60. Fungal contamination was less than 10<sup>1</sup> CFU/g in both solutions.

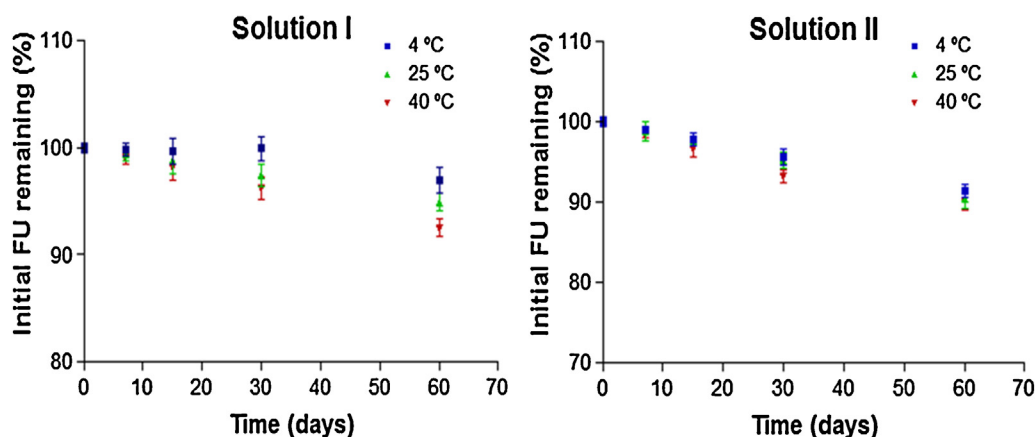
After analysing the drug uniformity of content of 10 mL aliquots of FUR solutions (I and II) it was observed that samples had a drug concentration within the pre-established rank from 90–110% (Fig. 1). This justified that formulations were compounded as solutions instead suspensions.

### 3.2. Intestine permeation study

The permeation profiles of FUR through pig small intestine from solutions were typical steady state profiles (Fig. 2). After a lag time of 30 min a nearly linear relationship between cumulative amounts of drugs permeated versus time could be observed, indicating that the pig small intestine integrity was maintained throughout the experiment and the permeation rates were constant. As it is shown in Fig. 2, the mean profile of FUR permeated from solution I versus time was greater than solution II.  $P_{eff}$  values were  $2.5 \times 10^{-6}$  cm/s and  $0.208 \times 10^{-7}$  cm/s for solutions I and II, respectively.

## 4. Discussion

Organoleptic characteristics are crucial in oral administration for children compliance. EMA paediatric investigation plan (PIP)



**Fig. 1.** Initial furosemide content remaining (%) analysed by spectrofluorometry along the study at three different temperatures for solutions I and II.

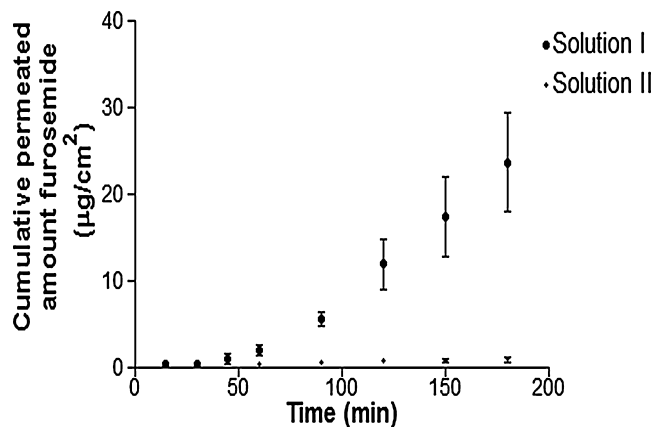


Fig. 2. Permeation profiles of furosemide from solutions I and II when passed through porcine small intestine.

guidelines stress this particular relevance in the development of oral formulations for children (European Medicines Agency (EMA), 2006). The loss of pharmacological and sensory attributes depends on the type of elaboration or storage process and the sensitivity of specific pharmaceutical components. Often, storage is accompanied by chemical reaction and physical or structural changes that can affect both pharmacological and sensory qualities as colour, texture or pH.

Colour changes were more intense in solution I, which could be attributable to caramelisation reactions. Caramelisation occurs when carbohydrates are exposed to high temperatures with no amino groups involved. This phenomenon is influenced by pH, impurities (salts) and sucrose concentration of the solution (Quintas et al., 2007). A change in colour can also be caused by the degradation of excipients like glycerol. In solution II, xanthan gum may act as a potential anti-oxidant (Trommer and Neubert, 2005). Therefore, storage at 4 °C or 25 °C were optimal conditions for developed formulations.

A buffer carbonate/bicarbonate solution at pH 10 was used to prepare both solutions because the stability of FUR is pH-dependent, exhibiting excellent stability at high pH value (Shah et al., 1980).

Oral viscosity also plays an important role in the textural appreciation of liquid or fluid pharmaceuticals. Oral shear stress was calculated on the assumption that the mouth is comparable to parallel plate geometry on a rheometer (Ferry et al., 2006).

The presence of xanthan gum in solution II resulted in a two-fold increase in viscosity with respect to solution I; however, this difference was not perceived by the palate. Viscosity measurements were performed with an imposed shear rate ( $\dot{\gamma}$ ), and the resulting shear stress ( $\tau$ ) was measured. This test is able to determine whether the material is characterized by linear-viscous (Newtonian) behaviour (shear stress exponent  $n = 1$ ) in the shear rate range of interest or whether it shows power-law behaviour ( $n \neq 1$ ). The potential dependence of the viscosity of the solutions on shear rate is shown in Fig. 3. The curve for solution I showed constant viscosity values with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ , and thus Newtonian behaviour. In contrast, solution II showed small dependence on shear rate with consistent although relatively small decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to  $100 \text{ s}^{-1}$ . This is the typical behaviour of pseudoplastic fluids probably due to the shearing action on the long chain molecule of xanthan gum. As shearing stress increases, the disarranged molecules start to align their long axes in the direction of the flow (Martin, 1993; Ofner et al., 1996). In this case, the hysteresis loop is inappreciable, indicative that solution II did not show thixotropy.

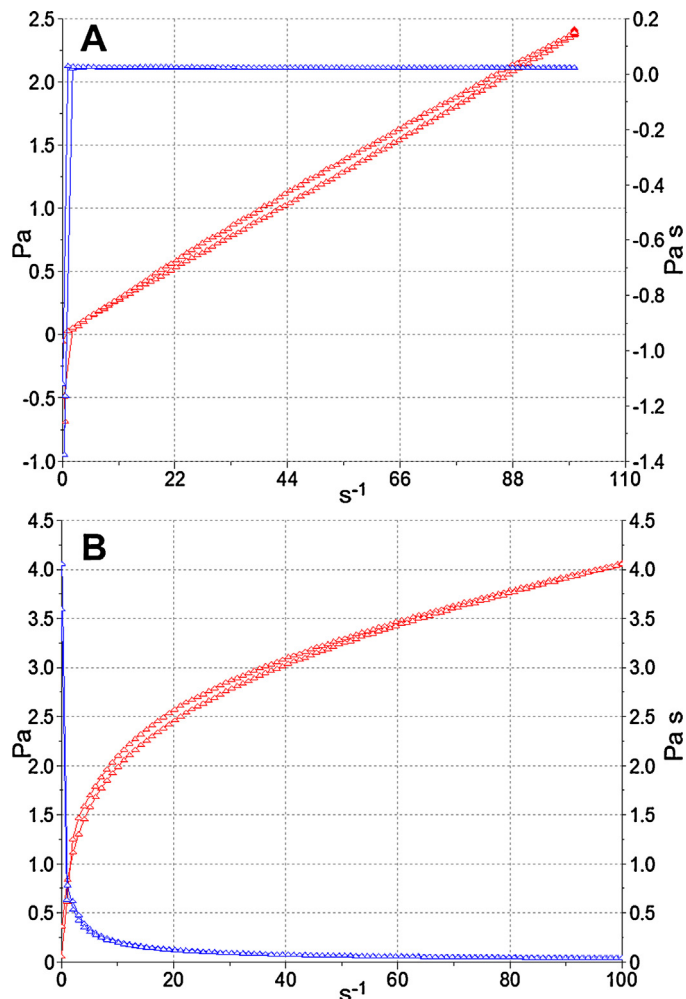


Fig. 3. Viscosity curves for solution I (A) and solution II (B). Graphs represent shear stress (Pa) and viscosity (Pa.s).

Viscosity values showed no significant differences at the end of the study, thus indicating that temperature did not affect this parameter (Table 4).

For solution II (pseudoplastic), rheological parameters were fitted to various mathematical models to identify which one provided the best overall match of experimentally observed data based on the highest correlation coefficient of the linear regressions ( $r$ ) and the lowest chi square value. The Cross equation was the model that best fitted experimental data in all cases, showing that flow behaviour was not influenced by time or temperature. The Cross equation provides a general model for pseudoplastic materials.

Microbial contamination in non-sterile liquid formulations may cause foul odour and turbidity, and may adversely affect the palatability and appearance. Furthermore, a high concentration of microorganisms may be hazardous to health especially in immunocompromised patients.

Microbiological studies indicated that both solutions complied with the European Pharmacopoeia specifications on microbial examination of non-sterile products over 60 days.

In order to validate this methodology, firstly, a FUR solution in the receptor medium was permeated through porcine small intestine in the Franz diffusion cells and  $P_{\text{eff}}$  was calculated being  $0.46 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ . Obtained permeability using porcine small intestine was quite similar to those obtained with Caco-2 cells, being in the range of  $0.1\text{--}0.5 \times 10^{-6}$  (Granero et al., 2010). Thus this

methodology was suitable for our aim. Caco-2 cells model is the most advanced and frequently used cell model to predict small-intestine drug permeability and absorption. Compared to Caco-2 cells, the present *ex vivo* assay does not have disadvantages such as long cell growth cycles, possibility of microbial contamination, high costs, and relatively wide inter-experiment and inter-laboratory variations, which limit Caco-2 cells as high-throughput screening systems.

It has been widely reported that permeability of FUR can be affected by the presence of some excipients (Granero et al., 2010). Permeation is a multi-factorial multi-step process, in our study all factors were equal except excipients present in solutions. So, presence of xanthan gum in solution II could create a film which restricts the FUR contact with microvilli.

The maximum fluorescence intensity for FUR was recorded at acidic pH, which could be explained by the presence of a totally undissociated carboxylic group, which may form intermolecular hydrogen bonds with the carboxylic groups of other FUR molecules. FUR is more stable at basic pH (Shah et al., 1980), therefore diluted samples of the oral solutions for spectrofluorometry were analysed immediately after their preparation and after 24 h of storage at 4 °C. The same results were obtained. Storage of the samples at 4 °C in acidic conditions did not affect their stability. This observation could be explained by their high grade of dilution. No precipitation of the samples was observed. At optimal pH and excitation conditions of FUR, excipients of solutions I and II did not present interferences with the fluorescent emission of FUR. Therefore, an extraction procedure was not required.

## 5. Conclusions

Accurate characterization of the paediatrics gastrointestinal tract is complex and is associated with many ethical issues that prevent access to methodology previously used in adult populations. Therefore, there is a need to use alternative means of obtaining the required data to evaluate paediatric biological parameters influencing the bioavailability. In this work two new oral liquid formulations of FUR for paediatrics have been developed from pure powder. Both formulations were stable from a physicochemical and microbiological point of view maintaining the API content constant in the acceptable limits at different storage conditions. The permeation study using porcine small intestine was designed to provide reliable data about potential efficacy of FUR, and compared with other authors using Caco-2 cells. Results showed that solution I exhibited a potential higher absorption profile than solution II, probably due to the content of xanthan gum in the former. All these findings make possible to guarantee a correct dosification, administration and potential efficacy of FUR when is formulated in liquid oral forms for the treatment of cardiac and pulmonary disorders in children.

## Acknowledgements

This research was supported by MAT2011 (Ministry of Science and Innovation, Spain), Grant 26994. The authors thank Dr. L. Halbaut for technical support in the rheological studies and the Permanent Commission for Uniform Compounding Paediatric Criteria (Spain).

## References

Agyralides, G.G., Dallas, P.P., Rekkas, D.M., 2004. Development and *in vitro* evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques. *Int. J. Pharm.* 281, 35–43.

- Allen, L.V., 2008. Dosage form design and development. *Clin. Ther.* 30, 2102–2111.
- Bauters, T., Claus, B., Willems, E., De Porre, J., Verlooy, J., Benoit, Y., Robays, H., 2012. What's in a drop? Optimizing strategies for administration of drugs in pediatrics. *Int. J. Clin. Pharm.* 4, 679–681.
- Brazy, P.C., Gunn, R.B., 1976. Furosemide inhibition of chloride transport in human red blood cells. *J. Gen. Physiol.* 68, 583–599.
- Budavari, S., 1989. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, eleventh ed. Rahway, New York.
- Dumont, R.C., Rudolph, C.D., 1994. Development of gastrointestinal motility in the infant and child. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 23, 655–671.
- European Medicines Agency (EMA), 2006. <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg20061901/reg20061901en.pdf> (accessed 28.07.14).
- European Pharmacopoeia 7.0. <http://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-publications-1401.html> (accessed 25.07.14).
- Ferry, A.L., Hort, J., Mitchell, J.R., Cook, D.J., Lagarrigue, S., Valles Pamies, B., 2006. Viscosity and flavour perception: why is starch different from hydrocolloids? *Food Hydrocoll.* 20, 855–862.
- Foye, W.O., Lemke, T., Williams, D.A., 1995. *Principles of Medicinal Chemistry*, fourth ed. Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Giebisch, G., 1985. The use of a diuretic agent as a probe to investigate site and mechanism of ion transport process. *Arzneimittelforschung* 35, 336–342.
- Granero, G.E., Longhi, M.R., Mora, M.J., Junginger, H.E., Midha, K.K., Shah, V.P., Stavchansky, S., Dressman, J.B., Barends, D.M., 2010. Biowaver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *J. Pharm. Sci.* 99, 2544–2556.
- ICH, 2006. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). <http://www.ema.europa.eu> (accessed 28.07.14).
- Jung, S.J., Choi, S.O., Um, S.Y., Kim, J.I., Choo, H.Y., Choi, S.Y., Chung, S.Y., 2006. Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure–permeability relationship. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 469–475.
- Karkhile, V.G., Karmarkar, R.R., Sontakke, M.A., 2010. Formulation and evaluation of floating tablets of furosemide. *Int. J. Pharm. Res. Dev.* 1, 1–9.
- Martin, A., 1993. *Physical Pharmacy*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Martín-Villena, M.J., Fernández-Campos, F., Calpena-Campmany, A.C., Bozal-de Febrer, N., Ruiz-Martínez, M.A., Clares-Naveros, B., 2013. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: development and characterization. *Carbohydr. Polym.* 94, 1–11.
- Moyao-García, D., Corrales-Fernández, M.A., Blanco-Rodríguez, G., Sánchez-Hernández, E., Nava-Ocampo, A.A., 2001. Benefits of oral administration of an electrolyte solution interrupting a prolonged preoperative fasting period in pediatric patients. *J. Ped. Surg.* 36, 457–459.
- Nahata, M.C., Allen, L.V., 2008. Extemporaneous drug formulations. *Clin. Ther.* 30, 2112–2119.
- Ofner, C.M., Schnaare, R.L., Schwartz, J.B., 1996. Reconstitutable oral suspensions. In: Lieberman, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S. (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*. Marcel Dekker, New York, pp. 247–249.
- Provenza, N., Calpena, A.C., Mallandrich, M., Halbaut, L., Clares, B., 2014. Design and physicochemical stability studies of paediatric oral formulations of sildenafil. *Int. J. Pharm.* 460, 234–239.
- Quintas, M.A.C., Brandão, T.R.S., Silva, C.L.M., 2007. Modelling colour changes during the caramelisation reaction. *J. Food Eng.* 83, 483–491.
- Salgado, A.C., Rosa, M.L., Duarte, M.A., Almeida, A.J., 2005. Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, 68–73.
- Sanderson, I.R., Walker, W.A., 1999. *Development of the Gastrointestinal Tract*. B.C. Decker, Ontario.
- Santoveña, A., Hernández-Paiz, Z., Fariña, J.B., 2012. Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. *Int. J. Pharm.* 423, 360–364.
- Shah, K.A., Das Gupta, V., Stewart, K.R., 1980. Effect of pH, chlorbutanol, cysteine hydrochloride, ethylenediaminetetraacetic acid, propylene glycol, sodium metabisulfite, and sodium sulfite on furosemide stability in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* 69, 594–596.
- Smith, D.E., Lin, E.T., Benet, L.Z., 1980. Absorption and disposition of furosemide in healthy volunteers: measured with a metabolite-specific assay. *Drug Metab. Dispos.* 5, 332–337.
- Standing, J.F., Tuleu, C., 2005. Paediatric formulations—getting to the heart of the problem. *Int. J. Pharm.* 300, 56–66.
- The United States Pharmacopoeial Convention, 2007. *Compounded preparations*. The United States Pharmacopoeia 30—The National Formulary 25, 1. Port City Press, Baltimore, pp. 332.
- Trommer, H., Neubert, R.H., 2005. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *Int. J. Pharm.* 298, 153–163.
- Waller, D.G., 2007. Off-label and unlicensed prescribing for children: have we made any progress? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 64, 1–2.
- Wening, K., Breitkreutz, J., 2011. Oral drug delivery in personalized medicine: unmet needs and novel approaches. *Int. J. Pharm.* 404, 1–9.
- Winckler, S.C., 2002. Extemporaneous compounding: a return to regulatory limbo? *J. Pain Palliat Care Pharmacother.* 16, 71–78.

## **5. DEVELOPMENT AND STABILITY STUDY OF SOLUTIONS CONTAINING METHANDONE OR PHENOBARBITAL FOR THE TREATMENT OF NEONATAL ANSTINENCE SYNDROME.**

El Síndrome de Abstinencia Neonatal (SAN) es el resultado de la exposición fetal al consumo ilícito de drogas o de medicamentos con receta por parte de la madre antes de dar a luz. Se estima que entre el 30% y el 80% de los recién nacidos expuestos a los opiáceos en el útero va a necesitar tratamiento para el SAN.

La mayoría de los médicos usan un opiáceo (morfina o metadona) como fármaco de primera elección y el fenobarbital como segunda línea de tratamiento si el opiáceo no controla adecuadamente los signos de abstinencia, pero hoy en día, la metadona y el fenobarbital se comercializan en formas farmacéuticas no aptas para la población pediátrica.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar tres soluciones orales de metadona (0.2 mg/ml) y dos soluciones orales de fenobarbital (300 mg/ml) en vehículos comerciales. Se realizó la selección del envase y se estudió tanto la estabilidad fisico-química como la microbiológica de las formulaciones para garantizar la administración de la dosis correcta, la eficacia del tratamiento y establecer un período de almacenamiento adecuado para su uso en pediatría.



# AAPS PharmSciTech

## Development and stability study of solutions containing methadone or phenobarbital for the treatment of neonatal abstinence syndrome

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Development and stability study of solutions containing methadone or phenobarbital for the treatment of neonatal abstinence syndrome
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Section/Category:</b>	NOT APPLICABLE (Choose this section if you have NOT been invited to submit a manuscript)
<b>Keywords:</b>	Methadone, phenobarbital, neonatal abstinence syndrome, pediatric formulations.
<b>Corresponding Author:</b>	Beatriz Clares, Ph.D. University of Granada Granada, SPAIN
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	Naveros
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	University of Granada
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Nora Provenza, Ph.D.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Nora Provenza, Ph.D. Ana C Calpena, Ph.D. Mireia Mallandrich, Ph.D. Blanca Pueyo, Ph.D. Beatriz Clares, Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	Naveros
<b>Manuscript Region of Origin:</b>	SPAIN
<b>Abstract:</b>	<p>Elaborating new pediatric formulations when no commercial forms are available is a common practice in pharmacy laboratories; among these, oral liquid formulations are the most common. But due to the lack of specialized equipment, frequently studies to assure the efficiency and safety of the final medicine cannot be performed. Thus the purpose of this work was the development, characterization and stability evaluation of solutions of methadone (MI, MII, MIII) and phenobarbital (PI, PII) for the treatment of neonatal abstinence syndrome (NAS).</p> <p>After the establishment of a standard operating procedure (SOP) and elaboration, the physicochemical stability parameters appearance, pH, rheological behavior, and drug content of formulations were evaluated at three different temperatures for 90 days. Equally, microbiological stability was performed. Selection of the container prior to the stability study was performed for methadone solutions.</p> <p>Changes in color observed in both solutions of phenobarbital led to advise to store the solutions below 25 °C. pH did not change in solutions of methadone and let phenobarbital keeping solubilized for 90 days. Developed formulations showed Newtonian behavior and remained constant after storage assuring uniform distribution of the drug in the formulations. Generally, the degradation of the drug in solutions stored at 4 °C fitted to Plateau then decay to zero model followed by one phase exponential. Finally, all solutions met microbial specifications of non-sterile products. All these findings make possible to guarantee a correct dosage and administration of methadone and phenobarbital when they are formulated in liquid oral forms for the treatment of NAS.</p>



## **Development and stability study of solutions containing methadone or phenobarbital for the treatment of neonatal abstinence syndrome**

Nora Provenza<sup>1</sup>, Ana C. Calpena<sup>1</sup>, Mireia Mallandrich<sup>1</sup>, Blanca Pueyo<sup>1</sup> and Beatriz Clares<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>2</sup> *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja street s/n, 18071 Granada, Spain*

### **\* Corresponding Author**

Beatriz Clares,

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy

University of Granada, Campus of Cartuja street s/n, 18071 Granada, Spain.

Tel: +34 958 243904; fax: +34 958 248958; E-mail address: beatrizclares@ugr.es

**Methadone or Phenobarbital formulations for NAS (suggested running head)**

**1 ABSTRACT**

2 Elaborating new pediatric formulations when no commercial forms are available is a  
3 common practice in pharmacy laboratories; among these, oral liquid formulations are  
4 the most common. But due to the lack of specialized equipment, frequently studies to  
5 assure the efficiency and safety of the final medicine cannot be performed. Thus the  
6 purpose of this work was the development, characterization and stability evaluation of  
7 solutions of methadone (MI, MII, MIII) and phenobarbital (PI, PII) for the treatment of  
8 neonatal abstinence syndrome (NAS).

9 After the establishment of a standard operating procedure (SOP) and elaboration, the  
10 physicochemical stability parameters appearance, pH, rheological behavior, and drug  
11 content of formulations were evaluated at three different temperatures for 90 days.  
12 Equally, microbiological stability was performed. Selection of the container prior to the  
13 stability study was performed for methadone solutions.

14 Changes in color observed in both solutions of phenobarbital led to advise to store  
15 the solutions below 25 °C. pH did not change in solutions of methadone and let  
16 phenobarbital keeping solubilized for 90 days. Developed formulations showed  
17 Newtonian behavior and remained constant after storage assuring uniform distribution  
18 of the drug in the formulations. Generally, the degradation of the drug in solutions  
19 stored at 4 °C fitted to Plateau then decay to zero model followed by one phase  
20 exponential. Finally, all solutions met microbial specifications of non-sterile products.  
21 All these findings make possible to guarantee a correct dosage and administration of  
22 methadone and phenobarbital when they are formulated in liquid oral forms for the  
23 treatment of NAS.

24 **KEY WORDS:** Methadone; phenobarbital; neonatal abstinence syndrome; pediatric  
25 formulations.

26 **INTRODUCTION**

27 Opioid dependence in pregnant women is a major public health issue associated with  
28 high costs to society and at a personal level for women and their children (1). Maternal  
29 opioid use during gestation predisposes the infant to signs and symptoms of central and  
30 autonomic nervous system regulatory dysfunction, traditionally defined as Neonatal  
31 Abstinence Syndrome (NAS) (2). It is estimated that between 50% and 90% of infants  
32 exposed to opiates *in utero* will develop signs and symptoms of NAS (3), and  
33 approximately 30–80% of infants born to women on opioids will require treatment for  
34 opioid withdrawal (4, 5).

35 The need for pharmacologic therapy of NAS has been frequently assessed by a few  
36 scoring scales for full term infants such as the Finnegan neonatal abstinence scoring  
37 system or the Lipsitz neonatal drug-withdrawal scoring system. The decision to use a  
38 drug therapy should be individualized based on the severity of signs of abstinence and  
39 assessment of risks and benefits of therapy. Recent surveys have documented that, in  
40 accord with the recommendations of that statement, 94% of UK and 83% of US  
41 clinicians use an opioid (morphine or methadone) as the drug of first choice (6). The  
42 majority of practitioners in neonatology services use phenobarbital as a second drug if  
43 the opiate does not adequately control withdrawal sign (7, 8).

44 The initial dose of methadone used in the treatment of NAS is 0.05–0.1 mg/kg every 6 h  
45 with increments of 0.05 mg/kg until NAS score stabilization. Once symptoms are  
46 controlled methadone is administered every 12–24 h and discontinued after weaning to  
47 dose of 0.05 mg/Kg/day (3, 9). In case of phenobarbital, the initial dose is 16 mg/kg/day  
48 divided doses (8–12 h). Increase dose by 0.05 mg/Kg until signs of withdrawal are  
49 controlled. When signs are controlled, give dose every 12–24 h and discontinued after  
50 weaning to dose of 0.05 mg/kg/day. Maintenance dose is 2 to 8 mg/kg/day (3, 9).

51 Nowadays, methadone and phenobarbital are marketed in pharmaceutical forms not  
52 suitable for pediatric population. Many medicinal products are not currently available in  
53 formulations suitable for administration to the pediatric population (10). Nearly 75%  
54 of the drugs available in the United States for adults have not been labeled for use in  
55 infants and children, even though these drugs may be needed in this population (11, 12).  
56 Consequently, healthcare professionals frequently resort to the preparation and  
57 administration of unlicensed formulations by manipulation of adult dosage forms.  
58 Elaborating new pediatric formulations when no commercial forms are available is a  
59 common practice in pediatric pharmacy practice (13), among these; oral liquid  
60 formulations are the most common (14). This manipulation should be the last resort, but  
61 at the same time it is recognized as an unavoidable and necessary operation in many  
62 cases.

63 Personalized medicine is a challenging research area in pediatric treatments to achieve  
64 effective, stable and well-tolerated drug formulations. However, a major problem  
65 remains with many liquid preparations due to the absence of information regarding  
66 suitability and stability (15). The variability in the design of such preparations,  
67 sometimes with an unknown low stability, leads to the possibility of medication errors  
68 in the handling of the dosages. Successful development of a formulation includes  
69 multiple considerations involving the drug, excipients, compliance, storage, packaging,  
70 and stability, as well as, patient considerations of taste appearance and palatability (16).

71 Although over the last years, many extemporaneously prepared methadone or  
72 phenobarbital-containing oral liquid formulations have been reported in the literature  
73 (17-19), in this work in order to facilitate and standardize the pharmaceutical  
74 compounding a Standard Operating Procedure (SOP) is provided by using commercial  
75 compounding excipients and flavoring agents that could successfully mask or disguise

76 the unpleasant bitter taste of methadone and phenobarbital. Therefore, three oral  
77 solutions of methadone (0.2mg/mL) and two oral solutions of phenobarbital (300  
78 mg/mL) using commercial vehicles were successfully elaborated. Selection of the  
79 container, the characterization and the physicochemical and microbiological stability of  
80 the formulations was evaluated to guarantee the correct dose administration, the  
81 efficiency of the treatment and to establish a right storage period for its use in pediatrics.

## 82 **MATERIAL AND METHODS**

### 83 **Chemicals**

84 Active pharmaceutical ingredients (API) methadone was obtained from Alcaliber S.A.  
85 (Madrid, Spain) and phenobarbital sodium from Fagron (Barcelona, Spain). Excipient  
86 for solutions (sucrose, water, sorbitol, glycerin, flavoring, citric acid, methylparaben,  
87 potassium sorbate, sodium phosphate, and coloring) and excipient for syrup sugar free  
88 (water, sorbitol, glycerin, flavoring, sodium saccharin, xanthan gum, citric acid,  
89 potassium sorbate, methylparaben, sodium citrate, propylparaben, and coloring) from  
90 Acofarma, S.A. (Barcelona, Spain). All other chemicals were all of analytical grade.

### 91 **General SOP**

92 Composition of the developed formulations of methadone and phenobarbital is reported  
93 in Table I, which were elaborated according to the following SOP: methadone was  
94 accurately weighed and dissolved in distilled water.  
95 After a complete solution was achieved, the mixture of excipient for  
96 suspensions/excipient for syrups (solution MI); excipient for suspensions/excipient for  
97 syrups sugar free (solution MII) or simple syrup for solution MIII was added. Due to the  
98 high amount of water in formulations of methadone, excipient for suspensions was used  
99 to increase their consistency. On the other hand, phenobarbital was accurately weighed  
100 and added to the buffer solution (pH=10). Once a homogeneous suspension was

101 obtained, excipient for syrups (solution P1) or excipient for syrups sugar free (solution  
102 PII) was added under stirring until a complete solution was achieved. As phenobarbital  
103 sodium is susceptible to precipitation, especially if the pH drops below 8.5–9, a  
104 carbonate/bicarbonate buffer solution was included. Both, MII and PII are suitable for  
105 diabetic patients. As controls, the same amounts of formulations without drugs (blank  
106 samples) were similarly prepared.

#### 107 **Selection of the container**

108 Prior to the stability study, a screening in order to choose the most adequate primary  
109 packaging material for the storage of solutions was performed. For that, a solution of  
110 methadone (0.2 mg/mL) in purified water was stored in aliquots of 10 mL for 90 days at  
111 4, 25 and 40° C in amber glass and in white polyethylene high density (PEHD) bottles.  
112 The remaining concentration of methadone was measured at the beginning and the end  
113 of the study. In case of phenobarbital, as a phenobarbital elixir BP 0.3% (w/v),  
114 marketed in amber glass bottles is available, it was considered not necessary the  
115 performance of any additional study and the studied oral solutions of phenobarbital  
116 were stored in amber glass bottles to perform their stability study.

#### 117 **Physicochemical characterization and stability studies**

118 Aliquots of 10 mL of each solution were stored in amber glass vials at three  
119 temperatures (4, 25 and 40 °C) for 90 days. Measures were performed at pre-selected  
120 times (0, 7, 15, 30, 60, and 90 days). Analyses comprised physicochemical testing of  
121 quantifiable parameters which could possibly change during storage period such as  
122 appearance, rheological behavior, pH and drug content.

#### 123 *Appearance*

124 The physical appearance properties were studied using a visual examination method of  
125 the samples stored at each temperature, thus parameters as odor, color or tendency to  
126 spontaneously form precipitates could be appreciated.

#### 127 2.4.2 Rheological behavior

128 The rheological characterization of the formulations was performed at 25 °C using a  
129 rotational rheometer Haake Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe,  
130 Germany) equipped with a parallel plate geometry set-up with a fixed lower plate and  
131 an upper plate (6 cm diameter). Different gaps between plates were tested and a  
132 separation of 0.2 and 0.5 mm for methadone and phenobarbital respectively was  
133 selected. The rheometer was connected to a computer provided with the software Haake  
134 Rheowin<sup>®</sup> Job Manager V. 3.3 to carry out the test and to analyze the obtained data  
135 Haake Rheowin<sup>®</sup> Data Manager V. 3.3. Viscosity curves and flow curves were recorded  
136 for 3 min during the ramp-up period from 0 to 100 s<sup>-1</sup>, 1 min at 100 s<sup>-1</sup> (constant shear  
137 rate period), and finally 3 min during the ramp-down period from 100 to 0 s<sup>-1</sup>. Viscosity  
138 value at 100 s<sup>-1</sup> were determined at t<sub>0</sub> and t = 90 days for the samples stored at 4, 25 and  
139 40 °C. All determinations were performed in triplicate. Data from the flow curve were  
140 fitted to different mathematical models, Newton when the solution had Newtonian  
141 behavior, Ostwald-De-Waele, Carreau-Yasuda, Cross and Herschel-Bulkley when the  
142 fluid was non-Newtonian.

#### 143 *pH measurements*

144 pH values were measured in triplicate using a digital pH/mV-meter micro-pH 200  
145 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain). Stability was evaluated as pH during the  
146 storage period (0, 7, 15, 30, 60 and 90 days) at three temperatures 4, 25 and 40 °C

#### 147 *Uniformity of API content*

148 Homogeneity of the solutions was examined at  $t=0$  to ensure that every vial contained  
149 no less than 90% and no more than 110% of the theoretically calculated and labeled  
150 amount of API per unit of volume. Six samples were taken from each vial and API  
151 contents were assayed. Relative standard deviation (%RSD) was used to assess the  
152 homogeneity of the solutions.

153 Absorbance of the samples was conducted by an UV/Visible spectrophotometer  
154 Ultrospec 1100 Pro (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at room  
155 temperature in 1 cm quartz cells at 200.2 nm and 240 nm for methadone and  
156 phenobarbital, respectively. Validation of the developed methodology was performed in  
157 accordance of international conference on harmonization guidelines Q2 (R1) (20)  
158 including the evaluation of the following characteristics: linearity, sensitivity, accuracy  
159 and precision.

160 The linearity of the methods was evaluated by constructing the calibration curve at six  
161 concentration levels for methadone (from 20 to 2.63  $\mu\text{g/mL}$ ) and at nine concentration  
162 levels (from 50 to 1.96  $\mu\text{g/mL}$ ) in case of phenobarbital. The calibration curves were  
163 validated interday ( $n = 6$ ) by different analysts and developed by plotting the instrument  
164 measurements versus the corresponding drug concentration. The least squares fit  
165 method was employed to statistically evaluate the results for linearity by a regression  
166 line and the corresponding slope, y-intercept and coefficient of linear correlation ( $r^2$ ).  
167 Furthermore, linearity was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) test  
168 to compare the absorbances versus nominal concentrations of each standard, and  
169 differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The least square  
170 linear regression analysis and mathematical determinations were performed by  
171 statistical software Prism<sup>®</sup>, V. 3.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).  
172 The selectivity of different assays was confirmed by the individual analysis of blank



173 samples assuring that no interferences took place. Sensitivity of the method was  
174 determined with respect to limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).  
175 LOD provides information on minimum level at which the active substances  
176 (methadone and phenobarbital) were reliably detected by the analysis of samples with  
177 known concentrations of methadone or phenobarbital and LOQ, in the same way,  
178 establishes the minimum level at which both drugs were quantified with acceptable  
179 accuracy and precision. Both parameters, LOD and LOQ were determined based on the  
180 standard deviation of the response and the slope of the calibration curve using the  
181 formula:

$$182 \text{ LOD or LOQ} = k \times \text{SD}_{\text{Sa}}/\text{Sb} \quad (1)$$

183 where k is the a factor related to the level of confidence, its value is 3.3 for LOD and 10  
184 for LOQ.  $\text{SD}_{\text{Sa}}$  is the standard deviation of the intercept and Sb is the slope. Accuracy  
185 was defined as the percentage of the systematic error, which is determined as  
186 standardized agreement between the measured value and the true value (relative error <  
187 10%). Finally, the precision of the assay was determined by the intraday repeatability,  
188 for this, the relative standard deviation (RSD) of replicates analyzed during the same  
189 day (while keeping the operating conditions identical) was calculated. Similarly, the  
190 intermediate precision (interday) was assessed by repeated analysis of the control  
191 samples in six different days.

### 192 **Degradation studies**

193 Two kinetic models (One phase exponential decay and Plateau then decay to zero), were  
194 used to fit the experimental data from the stability study of the API in the solutions. A  
195 non-linear regression was performed<sup>i</sup>. In addition, Akaike's information criterion (AIC)  
196 was determined for each model, as it is an indicator of the model's suitability for a  
197 given data set (21). The smaller the value of AIC, the better the model fits the data.

198 **Microbiological study**

199 The microbial count was considered to be the average number of colony forming units  
200 (cfu) found in agar. Oral solutions meet microbial requirements if the total aerobic  
201 microbial count is below 10<sup>2</sup> cfu/mL, the total combined yeast/mold count is below 10<sup>1</sup>  
202 cfu/mL and the absence of *Escherichia coli* is confirmed.

203 **Statistical analysis**

204 Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, followed by t-student test and  
205 represented as the mean of n replicates  $\pm$  SD. The level of significance was set at  $p <$   
206 0.05 (Prism<sup>®</sup>, V. 3.00 software).

207 **RESULTS**

208 **Selection of the container**

209 In the case of methadone, results of the screening between amber glass and PEHD  
210 bottles are displayed in Table II, showing that the less suitable packaging material at the  
211 three studied temperatures was the plastic one as the remaining methadone was lower,  
212 therefore stability study of the three oral solutions of methadone (MI, MII and MIII)  
213 was carried out in amber glass bottles. Same material was used to perform the stability  
214 study of phenobarbital.

215 **Physicochemical characterization**

216 After preparation, all formulations resulted to be solutions, transparent, slightly pink,  
217 with a characteristic fruity odor. There were no detectable changes in color or odor in  
218 any sample of methadone solutions during the two months of storage at the three  
219 controlled temperatures. However, the color of solutions of phenobarbital changed from  
220 day 7 at 40 °C. Same behavior was observed for blank solutions.

221 The potential dependence of the viscosity of the solutions on the shear rate is shown in  
222 Fig. 1 for methadone and phenobarbital solutions.

223 The curves for solutions MI, MIII and PI showed constant viscosity values with an  
224 increasing shear rate from 0 to 100 s<sup>-1</sup>, and thus the behavior was Newtonian. The slope  
225 of the flow curves of PI and MIII were constant and the graphs of viscosity were a line  
226 (22, 23). MI showed a very slightly pseudoplastic behavior probably due to a very low  
227 amount of xanthan gum present in its composition (excipient for suspensions). Viscosity  
228 values at 100 s<sup>-1</sup> were 7.99 ± 0.12; 15.12 ± 0.02 and 54.29 ± 0.16 mPa·s for MI, MII and  
229 MIII, respectively and 10.20 ± 0.04 and 29.77 ± 0.05 mPa·s for PI and PII respectively.  
230 No significant differences were observed at the end of the storage period (90 days) in  
231 any formulation.

232 Measurements of pH as a function of time at three temperatures are provided in Table  
233 III. Oral solutions of methadone (MI, MII and MIII) had a pH ranging between 4.0 and  
234 5.0 regardless temperature and time. Equally, the influence of the temperature on pH  
235 was studied by one-way ANOVA and no statistically significant differences were  
236 showed for MI, MII and MIII (p = 0.8689; 0.8690; and 0.3775 for formulation MI, MII  
237 and MIII respectively).

238 The analytical methods used for the quantification of APIs were linear, precise and  
239 accurate in the range of concentrations between 20 and 2.63 µg/mL for methadone, and  
240 between 50 and 1.96 µg/mL for phenobarbital. LOD was 1.02 ± 0.50 and 0.44 ± 0.28  
241 µg/mL for methadone and phenobarbital respectively, and the LOQ 3.08 ± 1.52 and  
242 1.32 ± 0.84 µg/mL for methadone and phenobarbital respectively. These results confirm  
243 the sensitivity of the methods. The accuracy values in both cases were within the  
244 acceptable limits (<10%). The small percentage of difference between the nominal and  
245 found concentration of the standards showed that the assay is accurate enough for their  
246 application. In both cases the RSD values (between-day precision) were below 10% at  
247 all concentrations, indicating that the assay methods were reproducible between days.

248 The analytical results showed that the methadone content of methadone remained above  
249 90% (w/v) of the original amount throughout 60 days at the three studied temperatures  
250 for MI; Solution MII was stable for 60 days when stored at 40 °C and for 90 days if it  
251 was stored at 4 and 25 °C as methadone was within the acceptance interval (> 90%) at  
252 t=90; and MIII was stable for 60 days when stored at 4 °C, 15 days at 25 °C and 7 days  
253 at 40 °C. Regarding the assay of API content in phenobarbital solutions, the analytical  
254 results showed that, phenobarbital remained above 90% for 60 days at 4 °C, 30 days at  
255 25 °C and 7 days at 40 °C in PI. In case of solution PII, concentration of phenobarbital  
256 remained above the 90 % of the original concentration for 30 days at 4 °C and 7 days at  
257 25 °C and 40 °C.

#### 258 **Degradation curves**

259 As it is shown in Table IV, Plateau then decay to zero was the model that best fit the  
260 data for degradation of MI at the three studied temperatures, for MIII at 4 °C, for PI at 4  
261 and 25 °C and for solution PII at 4 and 40 °C. This equation is used when there is a  
262 baseline (constant concentration of drug substance in this study) for a while and then, at  
263 some time, starts the decay. One phase exponential decay was the model that best fit the  
264 data for the degradation of the active substance in solution MII at the three studied  
265 temperatures, for solution PII at 25 °C and for solution MIII at 25 and 40 °C. In these  
266 cases, the rate of degradation could be proportional to the concentration of the drug in  
267 the formulation. As the drug concentration goes down, the rate of its degradation goes  
268 down as well.

269 The mean degradation profiles (n=3) for the studied solutions (MI, MII, MIII, PI and  
270 PII) are reported in Fig. 2.

#### 271 **Microbiological studies**

272 No *E. coli* contamination was found among assayed formulations, the total bacteria  
273 count was below 102 cfu/g and the fungal contamination was below 101 cfu/g at day 60  
274 of the study.

## 275 **DISCUSSION**

276 The development of age appropriate pediatric formulations is paramount to enable  
277 children adherence to treatment. It encompasses multi-dimensional considerations  
278 including the administration route, the formulation technology, the dosage strength and  
279 other parameters as organoleptic properties, viscosity and pH. The preparation of  
280 extemporaneous formulations often involves the use of commercial dosage forms and  
281 their conversion into new dosage forms that can be easily swallowed (10). However, the  
282 use of an API by modifying a commercially available tablet or capsule could have legal  
283 and clinical implications (24). Therefore, pure powder was used to prepare the  
284 solutions.

285 The proper packaging is essential for product stability and efficacious use. The USP  
286 advice to storage oral solutions of methadone and oral solutions of phenobarbital  
287 protected from light. Similar studies are found in the literature for methadone but in all  
288 of them the concentration of the API in solution is higher than those objects of our study  
289 (25). It is well known that a concentrated solution is thereby likely to be more stable  
290 than the same product in a diluted form (26). Therefore it was considered to perform a  
291 screening in order to choose the best container closure system for the oral solutions of  
292 methadone.

293 Organoleptic characteristics are crucial in oral treatments for children compliance to  
294 therapeutic regimens. The loss of pharmacological and sensory attributes depends on  
295 both the type of elaboration or storage process and the sensitivity of specific  
296 pharmaceutical components. Storage is accompanied by many changes, including

297 chemical reaction and physical and structural changes which affect both  
298 pharmacological and sensory qualities. In pediatric solutions generally involves a series  
299 of interdependent phenomena. These processes affect, to a varying degree, the quality  
300 attributes of color, texture and pH. The similar behavior observed in blank solutions  
301 suggested that this fact could be due to the exposition of excipients at high temperature  
302 at a more basic pH than they normally have. Therefore, from a stability point of view  
303 the storage of solutions of phenobarbital at 4 °C or 25 °C is generally more  
304 advantageous.

305 Oral viscosity plays an important role in the textural appreciation of liquid or fluid  
306 pharmaceuticals. Several measures derived from instrumental measurements have been  
307 described to correlate closely with perceived viscosity and therefore to describe the  
308 thickness signal interpreted by the brain. For example, the oral shear stress, calculated  
309 from the assumption that the mouth is comparable to parallel plate geometry on a  
310 rheometer (27). Viscosity measurements were made with an imposed shear rate and the  
311 resulting shear stress was recorded. This type of test can be used to determine whether  
312 the material is characterized by linear-viscous (Newtonian) behavior (shear stress  
313 exponent  $n = 1$ ) in the investigated shear rate range or if it shows power-law behavior ( $n$   
314  $\neq 1$ ). The curves for MII and PII (Fig. 1) were dependent on shear rate, showing a  
315 consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to 100 s<sup>-1</sup>. This is the  
316 typical behavior of pseudoplastic fluids. In all cases, the hysteresis loop is  
317 inappreciable, which indicates that MII and PII did not show thixotropy. It could be  
318 probably due to the presence of xanthan gum in formulation MII and PII (excipient for  
319 syrup sugar free in MII and PII and excipient for suspensions in MII) and the shearing  
320 action on the long chain molecule of xanthan gum. As the shearing stress is increased,  
321 the disarranged molecules start to align their long axes in the direction of the flow. This

322 orientation reduces the resistance which further allows lowering of viscosity at  
323 increasing shearing stress (28). This result is in accordance with previous reports where  
324 it is mentioned that xanthan gum exhibits plastic or pseudoplastic flow (29). No  
325 significant differences were observed at the end of the storage period (90 days) in any  
326 formulation indicative of a desired rheological stability. This stability is an important  
327 requirement because the dosage process should ensure uniform distribution of the API  
328 in the formulation, especially among pediatric patients.

329 A significant variance of pH over an adequate value per each formula could indicate a  
330 degradation of the pharmaceutical compounding or an erroneous elaboration.

331 Phenobarbital is a weak acid with a pKa of 7.4 (30), which means it would precipitate at  
332 pH below 8.3. Thus, a buffer carbonate/bicarbonate solution 2M (pH 10) was used for  
333 the elaboration of solutions PI and PII. At t=0, pH values (25 °C) were  $9.20 \pm 0.01$  for  
334 solution PI and  $9.79 \pm 0.01$  for solution PII. In both cases, there was a downward trend  
335 of pH when the temperature increased (Table III). Despite these significant differences  
336 ( $p < 0.05$ ), they were not considered relevant as pH remained over 8.3 along the 90 days  
337 of study, which allowed phenobarbital to keep in solution, not registering the apparition  
338 of precipitate.

339 A criterion for selecting the most appropriate drug degradation model was based on the  
340 best fitting model, which had the lowest value of AIC and the highest correlation  
341 coefficient of the linear regression ( $r^2$ ). Thus, the model statistically described the best  
342 drug degradation mechanism. Generally, the degradation of the API in the solutions that  
343 were stored at 4 °C fitted to Plateau model followed by one phase decay which could  
344 probable mean that low temperature allows to keep constant the concentration of the  
345 active substances in the solutions longer.

346 Microbial contamination in non-sterile liquid formulations may cause a foul odor,  
347 turbidity, and adversely affect palatability and appearance. Otherwise, a high level of  
348 microorganisms may be hazardous to health, especially in immunocompromised  
349 patients. The obtained results indicated that all solutions complied with the European  
350 Pharmacopoeia specifications on the microbial examination of non-sterile product at 90  
351 days.

## 352 **CONCLUSION**

353 From the obtained results it could be concluded that solution MI was stable from a  
354 physicochemical point of view for 60 days at the three studied temperatures; MII for 90  
355 days at 4 and 25 °C and 60 days when stored at 40 °C and MIII for 60 days if stored at 4  
356 °C, 15 days at 25 °C and 7 days at 4 °C. Regarding phenobarbital solutions, PI was  
357 stable for 60 days at 4 °C and 30 days at 25 °C. Solution PII was stable only for 7 days  
358 at 4 and 25 °C. Changes in color observed in both solutions of phenobarbital when  
359 stored at 40 °C, leads to advise to store the solutions below 25 °C. The statistical model  
360 that best described the degradation of the active substances in the solutions was also  
361 studied. pH did not show statistically significant differences with the assayed conditions  
362 of methadone solutions. Despite significant differences were found in pH measurements  
363 of phenobarbital solutions, pH of solutions PI and PII allowed keeping phenobarbital  
364 solubilized along the 90-days study. The rheological behavior also remained constant in  
365 both formulations. All these findings make possible to guarantee a correct dosage and  
366 administration of methadone and phenobarbital when they are formulated in liquid oral  
367 forms for the treatment of NAS.

## 368 **ACKNOWLEDGMENTS**

369 The authors gratefully acknowledge Acofarma S.A. for supplying excipients. We also  
370 thank Dr. Antoni Boix Montañes for his particular assistance.



371 **REFERENCES**

- 372 1 Unger A, Metz V, Fischer G. Opioid dependent and pregnant: what are the best  
373 options for mothers and neonates?. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:1–6.
- 374 2 Jansson LM, Velez M, Harrow C. The opioid-exposed newborn: assessment and  
375 pharmacologic management. *J Opioid Manag.* 2009;5:47–55.
- 376 3 D’Apolito K. Neonatal opiate withdrawals: pharmacologic management.  
377 *Newborn Infant Nurs Rev.* 2009;9:62–9.
- 378 4 Johnson K, Gerada C, Greenough A. Treatment of neonatal abstinence syndrome.  
379 *Arch Dis Child.* 2003;88:2–5.
- 380 5 Wouldes TA, Woodward LJ. Maternal methadone dose during pregnancy and  
381 infant clinical outcome. *Neurotoxicol Teratol.* 2010;32:406–13.
- 382 6 Hudak ML, Tan RC. The committee on drugs and the committee on fetus and  
383 newborn. Neonatal drug withdrawal. *Pediatrics.* 2012;129:e540–60.
- 384 7 O’Grady MJ, Hopewell J, White MJ. Management of neonatal abstinence  
385 syndrome: a national survey and review of practice. *Arch Dis Child.*  
386 2009;94:F249–52.
- 387 8 Sarkar S, Donn SM. Management of neonatal abstinence syndrome in neonatal  
388 intensive care units: a national survey. *J Perinatol.* 2006;26:15–7.
- 389 9 Bio LL, Siu A, Poon CY. Update on the pharmacologic management of neonatal  
390 abstinence syndrome. *J Perinatol.* 2011;31:692–701.
- 391 10 Nahata MC, Allen LV. Extemporaneous drug formulations. *Clin Ther.*  
392 2008;30:2112–9.
- 393 11 Johnson CE, Wagner DS, Bussard WE. Stability of dolasetron in two liquid  
394 vehicles. *Am J Health-Syst Pharm.* 2003;60:2242-4.

- 395 12 Pal V, Nahata M. Need for extemporaneous formulations in pediatric patients. *J*  
396 *Pediatr Pharmacol Ther.* 2001;6:107–19.
- 397 13 Santoveña A, Hernández-Paiz Z, Fariña JB. Design of a pediatric oral  
398 formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. *Int J Pharm.*  
399 2012;423:360–4.
- 400 14 Provenza N, Calpena AC, Mallandrich M, Halbaut L, Clares B. Design and  
401 physicochemical stability studies of paediatric oral formulations of sildenafil. *Int J*  
402 *Pharm.* 2014;460:234–9.
- 403 15 Brion F, Nunn AJ, Rieutord A. Extemporaneous (magistral) preparation of oral  
404 medicines for children in European Hospitals. *Acta Paediatr.* 2003;92:486–90.
- 405 16 Allen LV. Dosage form design and development. *Clin Ther.* 2008;30:2102–11.
- 406 17 Jelveghari M, Nokhodchi A. Development and chemical stability studies of  
407 alcohol-free phenobarbital solution for use in pediatrics: a technical note. *AAPS*  
408 *PharmSciTech.* 2008;9:939–43.
- 409 18 Lauriault G, LeBelle MJ, Lodge BA, Savard C. Stability of methadone in four  
410 vehicles for oral administration. *Am J Hosp Pharm.* 1991;48:1252–6.
- 411 19 Soy D, Roca M, Deulofeu R, Montes E, Codina C, Ribas J. Estabilidad de las  
412 soluciones orales de clorhidrato de metadona al 0.1% y 0.5% en suero fisiológico.  
413 *Farm Hosp.* 1998;22:249–51.
- 414 20 ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 2006.  
415 <http://www.ema.europa.eu>. (Accesed 06.10.2014).
- 416 21 Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion  
417 (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet*  
418 *Biopharm.* 1978;6:165–75.

- 419 22 Lee CH, Moturi V, Lee E. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. *J*  
420 *Control Release*. 2009;136:88–98.
- 421 23 Schellart WP. Rheology and density of glucose syrup and honey: Determining  
422 their suitability for usage in analogue and fluid dynamic models of geological  
423 processes. *J Struct Geol*. 2011;33:1079–88.
- 424 24 James A. The legal and clinical implications of crushing tablet medication. *Nurs*  
425 *Times*. 2005;100:28–9.
- 426 25 Denson DD, Crews JC, Grummich KW, Stirm EJ, Sue CA. Stability of  
427 methadone hydrochloride in 0,9 % sodium chloride injection in single-dose plastic  
428 containers. *Am J Hosp Pharm*. 1991;48:515–7.
- 429 26 Tønnesen HH. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *Int J Pharm*.  
430 2001;225:1–2.
- 431 27 Ferry AL, Hort J, Mitchell JR, Cooka DJ, Lagarrigueb S, Valles Pamiesc B.  
432 Viscosity and flavour perception: Why is starch different from hydrocolloids?.  
433 *Food Hydrocolloids*. 2006;20:855–62.
- 434 28 Martin A. *Physical Pharmacy*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p.393–6.
- 435 29 Ofner CM, Schnaare RL, Schwartz JB. Reconstitutable oral suspensions. In:  
436 Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS, editors. *Pharmaceutical dosage forms:*  
437 *dispersed systems*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 247–9.
- 438 30 Schmidt D, Kupferberg J. Diphenylhydantoin, phenobarbital, and primidone in  
439 saliva, plasma, and cerebrospinal fluid. *Epilepsia*. 1975;16:735–41.

440

441

442

443 **LEGEND TO FIGURES**

444 **Fig. 1.** Formulations rheograms. It shows the shear stress (Pa) (in red) and the viscosity

445 (Pa·s) (in blue)

446 **Fig. 2.** Degradation profiles (n=3) for the studied solutions at three temperatures

447

**Table I.** Composition of the studied solutions of methadone and phenobarbital

	Solution MI	Solution MII	Solution MII	Solution PI	Solution PII
Methadone (mg)	20	20	20	–	–
Phenobarbital sodium (mg) <sup>a</sup>	–	–	–	328.5	328.5
Distilled Water (mL)	50	50	10	–	–
Buffer carbonate/bicarbonate solution (pH=10) (mL)	–	–		25	25
Excipient for suspensions (mL)	25	25		–	–
Excipient for syrups (mL)	q.s. 100	–		q.s. 100	
Excipient for syrups sugar free (mL)	–	q.s. 100			q.s. 100
Simple Syrup (mL)	–	–	q.s. 100	–	–

<sup>a</sup> 328.5 mg of phenobarbital sodium are equivalent to 300 mg of phenobarbital

**Table II.** Stability of methadone (%) 0.2 mg/mL (distilled water) stored in HDPE and amber glass bottles

	HDPE bottles			Amber glass bottles		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
0 h		100			100	
90 days	95.7	91.3	86.9	96.5	95.6	87.2

**Table III.** pH values of the studied solutions (MI, MII, MIII, PI and PII) along the study

	Solution MI			Solution MII		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
t <sub>0</sub>	4.46±0.06	4.46±0.06	4.46±0.06	4.71±0.08	4.71±0.08	4.71±0.08
t=7	4.47±0.09	4.43±0.09	4.41±0.10	4.72±0.10	4.70±0.10	4.70±0.10
t=15	4.38±0.09	4.31±0.01	4.39±0.08	4.70±0.10	4.59±0.01	4.67±0.09
t=30	4.41±0.01	4.40±0.01	4.47±0.06	4.77±0.02	4.67±0.02	4.68±0.01
t=60	4.31±0.01	4.35±0.02	4.38±0.02	4.70±0.03	4.69±0.08	4.68±0.03
t=90	4.43±0.08	4.39±0.03	4.40±0.03	4.73±0.02	4.63±0.01	4.65±0.02

	Solution MIII		
	4°C	25C	40°C
t <sub>0</sub>	4.42±0.02	4.42±0.02	4.42±0.02
t=7	4.71±0.10	4.42±0.04	4.33±0.09
t=15	4.37±0.05	4.50±0.06	4.28±0.07
t=30	4.30±0.03	4.64±0.05	4.32±0.02
t=60	4.24±0.06	4.30±0.02	4.16±0.02
t=90	4.17±0.01	4.18±0.03	4.20±0.01

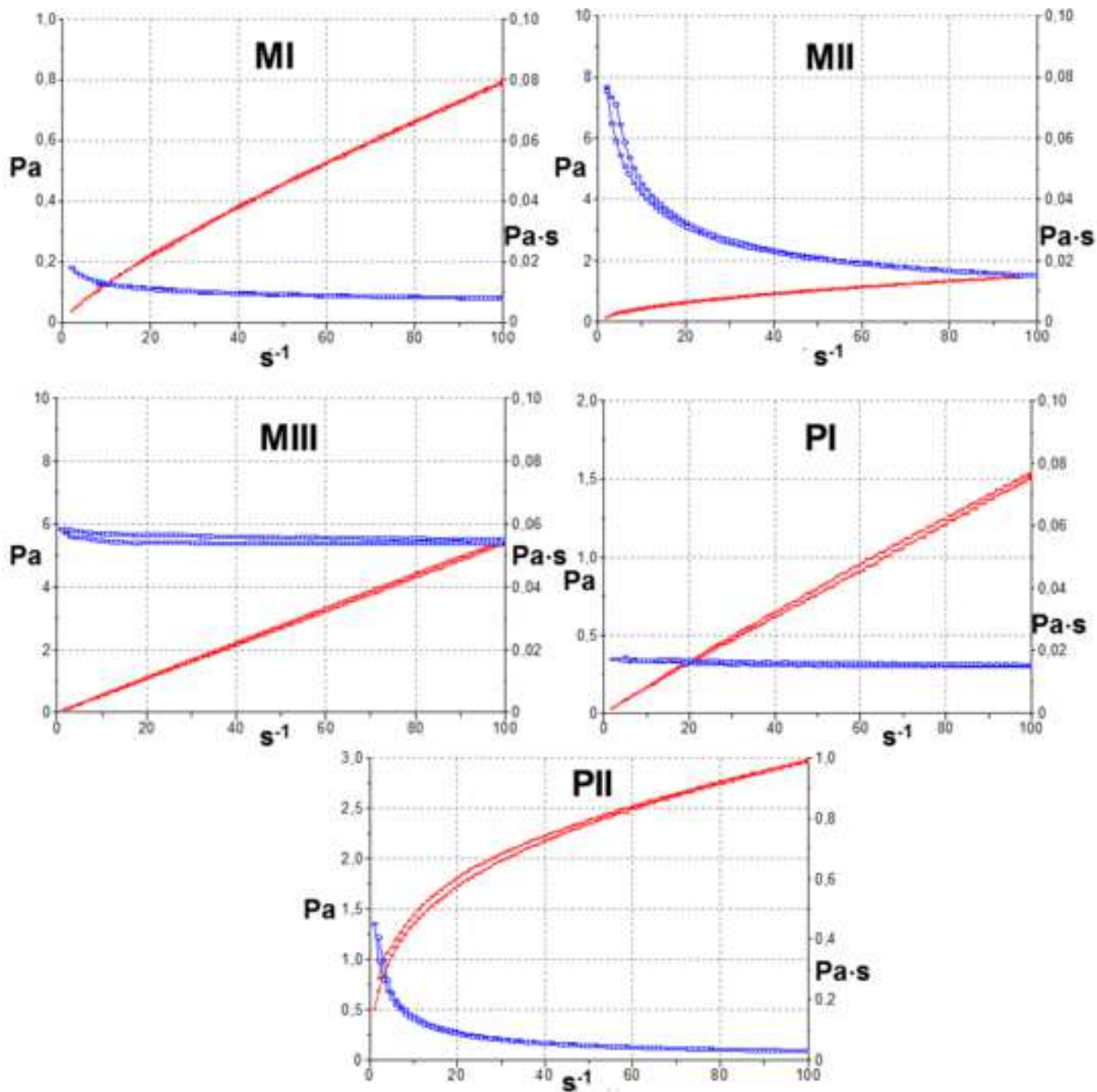
  

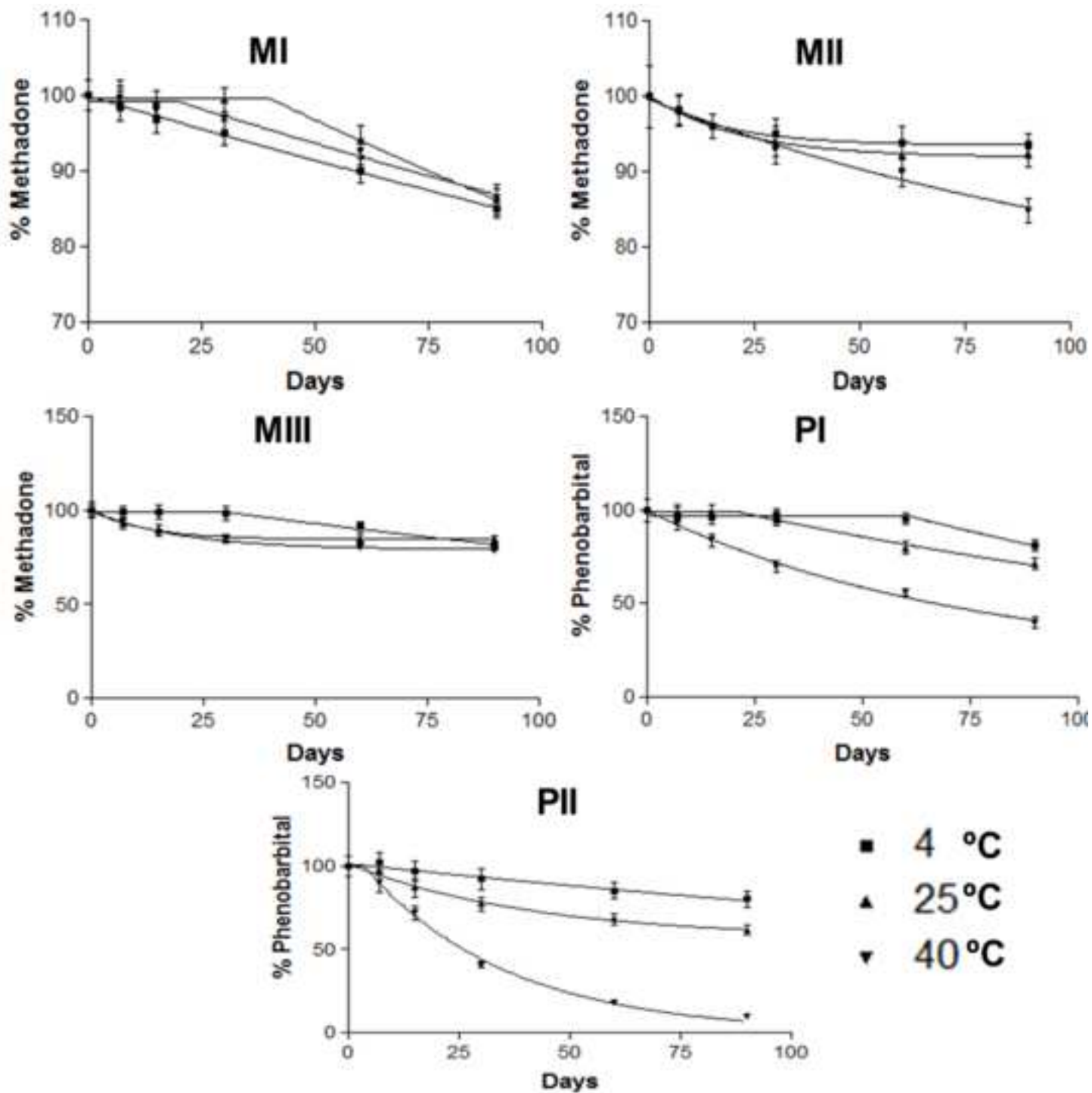
	Solution PI			Solution PII		
	4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
t <sub>0</sub>	9.21±0.03	9.21±0.03	9.21±0.03	9.79±0.02	9.79±0.02	9.79±0.02
t=7	9.20±0.01	9.16±0.02	9.04±0.02	9.79±0.03	9.79±0.03	9.72±0.01
t=15	9.24±0.04	9.15±0.03	8.80±0.02	9.68±0.01	9.68±0.02	9.60±0.03
t=30	9.19±0.02	9.13±0.02	8.82±0.01	9.80±0.05	9.76±0.04	9.60±0.02
t=60	9.32±0.03	9.15±0.01	8.66±0.04	9.72±0.02	9.63±0.01	9.22±0.03
t=90	9.20±0.02	9.18±0.03	8.44±0.02	9.80±0.01	9.78±0.05	9.15±0.02

**Table IV.** AIC values for all the formulations at the different studied temperatures (N/F, no fit)

	4 °C		25 °C		40 °C	
	Plateau then decay to zero	One phase exponential decay	Plateau then decay to zero	One phase exponential decay	Plateau then decay to zero	One phase exponential decay
Formulation MI	-2.89	N/F	4.08	N/F	12.25	N/F
Formulation MII	17.99	-2.47	20.34	-0.85	12.22	10.34
Formulation MIII	13.29	N/F	69.91	9.51	31.02	12.10
Formulation PI	19.66	N/F	5.33	N/F	23.21	17.71
Formulation PII	19.64	20.27	30.90	21.50	25.01	31.46









# **CAPÍTULO IV.**

## **DISCUSIÓN**

---



El desarrollo de formulaciones adecuadas a la población pediátrica es de suma importancia para la adherencia al tratamiento. Abarca consideraciones multidimensionales que incluyen la vía de administración, la tecnología de la formulación, la concentración de la dosis y otros parámetros como las propiedades organolépticas, la viscosidad o el pH. Por lo tanto, en este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo, la caracterización y el estudio de estabilidad a tres temperaturas (4, 25 y 90°C) durante un periodo máximo de 90 días de un total de trece fórmulas magistrales aptas para uso pediátrico, así como para personas que, por un motivo o por otro, tienen dificultades para deglutir.

	SLDI	SLDII	FURI	FURII	PI	PII		
Sildenafil (mg)	200	200						
Furosemida (mg)	-	-	200	200	-	-		
Fenobarbital sódico (mg)	-	-	-	-	328.5	328.5		
Tampón citrato (%-v/v)	10	10	-	-	-	-		
Tampón carbonato-bicarbonato (pH 10) (%-v/v)	-	-	10	10	25	25		
Excipiente para jarabe (mL)	45	-	q.s. 100	-	q.s. 100	-		
Excipiente para jarabe sin azúcar (mL)	-	45	-	q.s. 100	-	q.s. 100		
Agua destilada	q.s. 100	q.s. 100	-	-	-	-		
	SPI	SPII	SPIII	SPIV	MI	MII	MIII	
Espironolactona (mg)	500	500	500	500	-	-	-	
Metadona (mg)	-	-	-	-	20	20	20	
Glicerina (% m/v)	-	10	10	5	-	-	-	
Carboximetilcelulosa (%m /v)	-	-	0.2	-	-	-	-	
Agua destilada (mL)	-	-	-	-	50	50	10	
Jarabe simple (mL)	q.s. 100	q.s. 100	q.s. 100	-	-	-	q.s. 100	
Excipiente para suspensión (mL)	-	-	-	50	25	25	-	
Excipiente para jarabe (mL)	-	-	-	q.s. 100	q.s. 100	-	-	
Excipiente para jarabe sin azúcar (mL)	-	-	-	-	-	q.s. 100	-	

**Tabla 6.** Composición de las diferentes formulaciones.

<sup>(1)</sup>Excipiente para jarabe: sucrosa, agua, sorbitol, glicerina, aroma, ácido cítrico, metilparabeno, sorbato de potasio, colorante.

<sup>(2)</sup>Excipiente para jarabe sin azúcar: agua, sorbitol, glicerina, aroma, sacarina sódica, goma xantana, ácido cítrico, sorbato de potasio, metilparabeno, citrato de sodio, propilparabeno, colorante.

<sup>(3)</sup>Excipiente para suspensión: agua, carboximetilcelulosa sódica, celulose gum, ácido cítrico, fosfato de sodio, sulfato de calcio, metil parabeno, goma xantana, carragenina, sorbato de potasio, sucrosa, sorbitan triestearate, PEG-40 estearato, dimeticona, sílica

Tal como queda reflejado en la Tabla 6, se han estudiado dos fórmulas de sildenafilo (SLDI y SLDII), cuatro de espironolactona (SPI, SPII, SPIII y SPIV), dos de furosemida (FURI y FURII), tres de metadona (MI, MII y MIII) y dos de fenobarbital (PI y PII).

Como control, se prepararon las mismas formulaciones pero sin principios activos y se almacenaron a las mismas condiciones.

En cuestiones de homogeneidad de la dosis a administrar, las soluciones presentan una clara ventaja sobre las suspensiones, por lo que, siempre que ha sido posible, se ha tratado de desarrollar una solución.

En el desarrollo de las formulaciones también se tuvo en cuenta a la población diabética de modo que, tal y como se observa en la Tabla 6, SLDII, FURII y PII no contienen azúcar (sucrosa) en su fórmula.

El almacenamiento de las formulaciones se acompaña de muchos cambios, incluyendo reacciones químicas, cambios físicos y cambios estructurales que afectan tanto a cualidades farmacológicas como sensoriales. En las soluciones pediátricas, el almacenamiento, generalmente involucra una serie de fenómenos interdependientes que podrían afectar, en un grado variable, los atributos de la calidad de color, la textura y el pH. Por ello, a la hora de estudiar la estabilidad de estos preparados se han tenido en cuenta sus características físico-químicas y microbiológicas.

### ***Estabilidad física***

En los tratamientos orales, **las características organolépticas** son cruciales para la adherencia al tratamiento. Las recomendaciones de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en relación a los Planes de Investigación Pediátrica (PIP), señalan la particular relevancia del control de estos caracteres en el desarrollo de un tratamiento oral para niños (EMA, 2006). La pérdida de atributos tanto farmacológicos como sensoriales depende tanto del tipo de elaboración o del proceso de almacenamiento así como de la sensibilidad de los componentes farmacéuticos específicos.

A tiempo 0 ( $t_0$ ), MIII resultó ser una solución transparente, incolora o ligeramente amarillenta, de olor característico; SLDII, las dos formulaciones estudiadas de furosemida, MI y MII, así como las dos de fenobarbital resultaron ser soluciones

transparentes, de color rosado y olor afrutado. SLDI y las cuatro formulaciones de espirolactona resultaron ser suspensiones, fácilmente redispersables, de color rosado y olor afrutado. Las tres soluciones de metadona, así como todas las suspensiones estudiadas mantuvieron sus características organolépticas constantes a lo largo del estudio de estabilidad a las tres temperaturas estudiadas. Respecto a las soluciones de Furosemida y Fenobarbital, las cuatro mantuvieron sus características organolépticas a 4 y 25 °C mientras que a 40 °C el color se oscureció a partir del día 7. El mismo comportamiento fue observado para las soluciones control (sin principio activo) sugiriendo que el cambio podría ser debido a la exposición de los excipientes a altas temperaturas a un pH mucho más básico (alrededor de 8,5) del que normalmente están (alrededor de 4,5-5,0). Los cambios de color fueron más intensos en FURI y PI lo que podría ser atribuido a reacciones de caramelización, que es el nombre común que se le da a un grupo de reacciones que ocurre cuando los carbohidratos son expuestos a altas temperaturas sin haber grupos amino implicados. Esta reacción es influenciada por el pH, las impurezas (sales) y la concentración de azúcares en solución (Quintas y cols., 2007; Lowary y Richards, 1998). El cambio de color podría deberse también a la degradación de algunos excipientes como el glicerol. En las soluciones FURII y PII, la goma xantana podría actuar como un potencial anti-oxidante (Trommer y Neubert, 2005) por lo que en estas formulaciones el cambio de color es menos acusado. Por tanto, desde un punto de vista organoléptico, aunque estos cambios de color no tienen un impacto sobre la concentración del principio activo de la fórmula, se recomienda el almacenamiento de las soluciones a 4 y 25 °C.

La solución de sildenafil (SLDII- sin azúcar) presentó un precipitado de color blanco en el fondo del vial a partir del día 7 que no re-disolvía con la agitación en las muestras almacenadas a 4°C. Este hecho coincidió a su vez con una disminución de la concentración de sildenafil en solución a t=7 tal y como se verá más adelante.

La **viscosidad oral** juega un papel importante en la percepción de la textura de productos farmacéuticos líquidos o fluidos. Se han descrito algunas medidas instrumentales que correlacionan estrechamente la viscosidad medida con el espesor interpretado por el cerebro. Por ejemplo, la tensión de cizallamiento oral se calcula a partir de la suposición de que la boca es comparable a la geometría de placas paralelas en un reómetro (Ferry y cols., 2006). Las medidas de viscosidad se realizaron con una



velocidad de cizallamiento impuesta ( $\dot{\gamma}$ ), y se midió la tensión de cizalla resultante ( $\tau$ ). Este tipo de prueba se suele utilizar para determinar si el material se caracteriza por tener una viscosidad lineal (comportamiento newtoniano;  $n = 1$ ) en el rango de velocidad de cizalla investigado o si muestra un comportamiento de ley de potencia ( $n \neq 1$ ).

Las suspensiones SLDI, SPI, SPII y las soluciones FURI, MI, MIII y PI muestran valores de viscosidad constantes al aumentar la velocidad de cizalla de 0 a  $100 \text{ s}^{-1}$ , y por lo tanto describen un comportamiento newtoniano. En estos casos, la pendiente de la curva de flujo resultó ser constante y la gráfica de viscosidad, una línea (Schellart, 2011; Lee y cols., 2009). Las formulaciones SLDII, SPIII, SPIV, FURII, PII y MII presentan viscosidades ligeramente dependientes de la velocidad de cizalla, mostrando una constante disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de cizalla de 0 a  $100 \text{ s}^{-1}$ . Este es el comportamiento típico de fluidos pseudoplásticos y está de acuerdo con la bibliografía consultada en la que se indica que la goma xantana (presente en SLDII, SPIV, FURII, PII y MII) exhibe un comportamiento plástico o pseudoplástico (Bhargava y cols., 1996; Ofner y cols., 1996). Este comportamiento puede ser debido a la acción de cizallamiento en la molécula de cadena larga de la goma xantana. Como el cizallamiento aumenta el estrés, las moléculas desordenadas comienzan a alinear sus largos ejes en la dirección del flujo. Esta orientación reduce la resistencia, que permite el descenso adicional de la viscosidad con el aumento de la tensión de cizalla (Martin, 1993). El comportamiento pseudoplástico también es característico de las soluciones de carboximetilcelulosa, presente en SPIII (Cancela y cols., 2005). En todos los casos, el ciclo de histéresis es inapreciable, lo que indica que ninguna de estas formulaciones mostró tixotropía.

Tanto el comportamiento reológico como la viscosidad vienen determinados en gran medida por los excipientes presentes en la formulación independientemente de la naturaleza del principio activo y del pH de las formulaciones.

Los valores de viscosidad se determinaron a  $100 \text{ s}^{-1}$ . Las formulaciones que contienen jarabe simple mostraron valores de viscosidad más altos probablemente debido a la mayor concentración de sacarosa. SPIII registró el valor más alto de viscosidad, lo que podría ser debido a la mezcla de carboximetilcelulosa y jarabe simple (Cancela y cols., 2005). Puesto que SPI y SPII presentaron valores de viscosidad similares, se podría

decir que la presencia de glicerina no influye en la viscosidad de las formulaciones de espirolactona. La presencia de goma xantana en el Excipiente para jarabe sin azúcar utilizado para elaborar las formulaciones SLDII, FURII, PII y MII resulta en un incremento sustancial de la viscosidad con respecto a las formulaciones SLDI, FURII, PI y MI formuladas con Excipiente para jarabe que no contiene esta materia prima en su composición.

A excepción de las suspensiones de espirolactona SPIII y SPIV donde se observó una pequeña disminución de la viscosidad ( $p < 0,05$ ) al final del estudio en las muestras almacenadas a 40 °C que es el comportamiento típico de soluciones de carboximetilcelulosa (CMC) (Cancela y cols., 2005), todas las demás formulaciones estudiadas no mostraron diferencias significativas a lo largo del estudio, siendo este dato indicativo de que ni la temperatura ni el tiempo afectan a la viscosidad de estas formulaciones. Este hecho es especialmente importante en la población pediátrica sobre todo cuando la forma farmacéutica de la fórmula es una suspensión, ya que la viscosidad contribuye a asegurar una distribución uniforme del principio activo durante el proceso de dosificación.

En el caso de las formulaciones con comportamiento pseudoplástico (no newtoniano), los datos de la curva de flujo se ajustaron a varios modelos matemáticos: *Ostwald-de Waele*, *Carreau-Yasuda*, *Cross*, y *Herschel-Bulkley*. El objetivo de este estudio fue identificar el modelo que proporciona un mejor ajuste de los datos reológicos observados experimentalmente. El modelo que presentó un mayor coeficiente de regresión lineal ( $r$ ) y un valor menor de *chi* cuadrado, se consideró como el modelo que, estadísticamente, mejor describía el comportamiento reológico. *Cross* es el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales en todos los casos, excepto para MII donde lo fue el modelo *Ostwald-de-Waele*. Para el modelo de *Ostwald-de-Waele* la viscosidad absoluta disminuye a medida que la velocidad de cizalla aumenta. La ecuación representa la relación entre velocidad y esfuerzo de cizalla, al no existir término de punto de flujo los fluidos que se comporten según este modelo comenzarán a fluir a velocidad de cizalla cero. *Cross* proporciona un modelo general para los materiales pseudoplásticos, define el comportamiento de las soluciones de carboximetilcelulosa (CDER, 2009) y también se ha utilizado para caracterizar soluciones ópticamente claras (Cross, 1965).

En ningún caso el comportamiento del flujo se vio influenciado por el tiempo o por la temperatura.

Entre las características físicas, la **distribución del tamaño de partícula** (PSD) de la sustancia activa, es fundamental en el caso de las suspensiones (CDER, 2009). El tamaño de partícula de la sustancia activa en la suspensión puede afectar a la uniformidad de contenido ya que las partículas más grandes tienden a sedimentar más rápido que las de menor tamaño (FDA, 2009). Además, el PSD es un parámetro crítico que afecta significativamente a la biodisponibilidad y a la farmacocinética del producto (Kulshreshtha y cols., 2010). Por ello se determinó el PSD a  $t_0$  (justo después de la preparación de las formulaciones) y al final del estudio de todas las suspensiones mediante difracción de láser (LD).

Todas las suspensiones resultaron ser dispersiones gruesas (según la clasificación de Ostwald), ya que el tamaño de partícula es mayor que  $1\ \mu\text{m}$ . Las partículas en suspensión tienen una energía libre superficial que hace que el sistema sea inestable. La energía libre del sistema depende de la superficie total y de la tensión interfacial entre el medio líquido y las partículas sólidas que están en suspensión. Por lo tanto, para reducir al mínimo la energía libre, el sistema tiende a disminuir el área superficial mediante la formación de aglomerados (Kulshreshtha y cols., 2010). Este es el caso de SPI, que es la suspensión con el tamaño de partícula más grande. SPII, SPIII, y SPIV mostraron tamaños de partícula más pequeños, lo que se podría explicar por la presencia de un agente humectante que ayuda a reducir la tensión interfacial líquido-aire. Esto permite que el disolvente penetre en los aglomerados sueltos y por lo tanto desplace el aire de los poros de las partículas individuales (Kulshreshtha y cols., 2010). La suspensión de sildenafil (SLDI) es la que mostró un menor tamaño de partícula lo que podría ser debido a las propias características de esta formulación, que permite que un gran número de partículas de sildenafil se encuentren en solución y por tanto haya un menor número de partículas en suspensión. Los resultados obtenidos (Tabla 7) muestran que la distribución del tamaño de partícula fue constante para SPI durante todo el período de estudio, ya que tanto  $d_{10\%}$  como  $d_{90\%}$  se mantuvieron estables al final del estudio. Se observó un ligero aumento en la PSD al final del estudio en comparación con los valores obtenidos a  $t_0$  para las suspensiones SLDI, SPII, SPIII, y SPIV que no se

consideró relevante pues como se observará más adelante este aumento de la PSD no afectó a la uniformidad de contenido de principio activo presente en las suspensiones.

Distribución del tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )						
	$t_0$			Final del estudio		
	d10%	d50%	d90%	d10%	d50%	d90%
SLDI	3.24 ± 0.2	10,94 ± 0.1	31.36 ± 0.5	3.28 ± 0.1	12.86 ± 0.7	35.85 ± 0.4
SPI	16.2 ± 0.2	35.4 ± 0.8	73.7 ± 0.5	15.4 ± 0.5	28.4 ± 0.7	73.1 ± 0.9
SPII	6.6 ± 0.5	14.1 ± 0.8	27.9 ± 0.9	8.2 ± 0.8	16.3 ± 0.9	30.4 ± 0.8
SPIII	5.5 ± 0.2	12.7 ± 0.2	26.9 ± 0.6	9.1 ± 0.6	17.8 ± 0.9	33.1 ± 0.4
SPIV	8.8 ± 0.8	18.2 ± 0.9	33.3 ± 0.7	10.7 ± 0.4	21.3 ± 0.7	41.9 ± 0.9

**Tabla 7.** Distribución del tamaño de partícula para las suspensiones.

Con el objeto de determinar la **estabilidad física a largo plazo de las suspensiones** se utilizó una técnica basada en el análisis múltiple de dispersión de luz. Turbiscan® Lab es un instrumento óptico utilizado para caracterizar emulsiones y dispersiones concentradas. La suspensión a analizar se coloca en una célula de medición de vidrio cilíndrico y la fuente de luz es un haz de luz pulsada en el infrarrojo cercano ( $\lambda = 880$  nm). El equipo contiene dos sensores de fibra óptica que reciben la luz transmitida a través de la muestra o bien la luz retrodispersada por la misma. Por tanto, el principio de esta técnica se basa en la variación de la fracción del volumen de partículas (migración) o bien en la variación del tamaño de las partículas (unión) lo que resulta en variaciones en las señales de retrodispersión o *backscattering* (BS) o de transmisión de la luz (Celia y cols., 2009, Lemarchand y cols., 2003; Gonzalez-Mira y cols., 2010), detectando así fenómenos de sedimentación, floculación, coalescencia, separación de fases, flotación, etc. Las mediciones se realizaron a  $t_0$  y 25 °C.

En comparación con las técnicas clásicas, Turbiscan® Lab permite el estudio de la estabilidad física sin realizar ninguna dilución o modificación de la fórmula (Gonzalez-Mira y cols., 2010). Con esta técnica, el proceso de desestabilización se puede identificar y cuantificar fácilmente hasta 50 veces antes que con el ojo humano (Fernandez-Campos y cols., 2012). Para evaluar la estabilidad óptica, Turbiscan® Lab realiza un escáner en varios momentos pre-programados y superpone los perfiles obtenidos en un gráfico donde se muestran los fenómenos de desestabilización. Los fenómenos de migración se muestran por las variaciones locales del *backscattering* (Figura 3). Las variaciones de BS se muestran en el eje de ordenadas y la altura de la

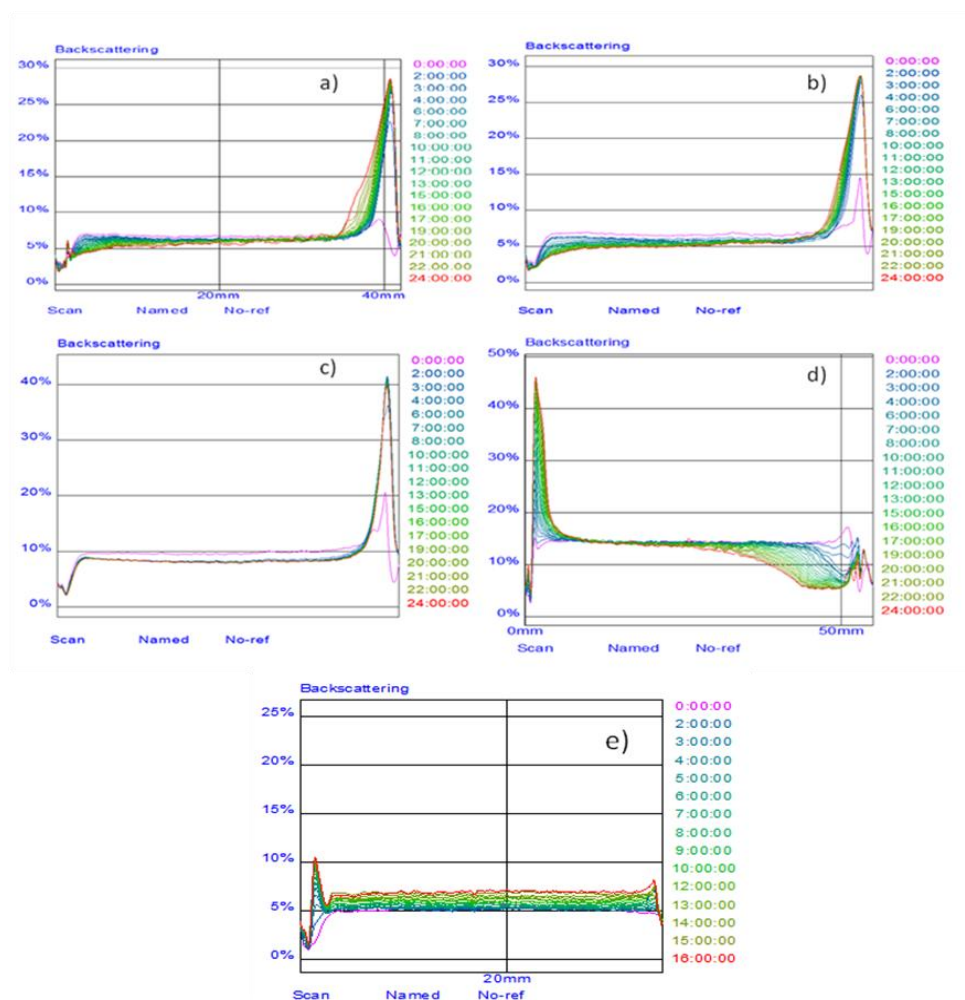
celda en el eje de abscisas (Celia y cols., 2009, Lemarchand y cols., 2003; Gonzalez-Mira y cols., 2010). El primer perfil se muestra en color rosa, y el último en rojo.

Como era de esperar, todas las suspensiones resultaron ser sistemas inestables.

El análisis de las suspensiones de espirolactona muestra que el *backscattering* de SPIV disminuye en la parte superior del vial (lado derecho del espectro) debido a una disminución en la concentración de partículas lo que se traduce en un aclaramiento de la suspensión en esta zona. El aumento de *backscattering* en la parte inferior del vial, refleja que se produjo un aumento en la concentración de partículas debido a la formación de un sedimento. En este caso, la presencia de disolventes y co-solventes como sorbitol, glicerina o polietilenglicol (PEG)-40 en SPIV, junto con agentes de suspensión tales como carragenina, que es un coloide hidrófilo que recubre partículas hidrófobas, y agentes floculantes (sulfato de calcio, fosfato de sodio), ayudaron a la floculación y sedimentación de las partículas de espirolactona tal como se muestra en la Figura 3. La presencia de estos ingredientes en SPIV también podría explicar el segundo PSD obtenido al final del estudio. Algo diferente ocurrió en el caso de SPI, SPII, y SPIII, donde el *backscattering* disminuyó en la parte inferior del vial (clarificación) y aumentó en la parte superior. Este comportamiento podría indicar que el agente humectante elegido, glicerina, no fue suficiente para humectar las partículas de espirolactona, y por lo tanto se observó un fenómeno de flotación. La desestabilización fue más lenta para SPIV que para las otras suspensiones. Esta característica es deseable, ya que permite que la formulación permanezca homogénea durante más tiempo.

En el caso de la suspensión de sildenafil (SLDI), los perfiles muestran un incremento del *backscattering* en el centro de la muestra, lo cual es indicativo de un incremento del tamaño de partícula (coalescencia o floculación). En este caso, no se observaron fenómenos ni de flotación ni de sedimentación. Los resultados de la predicción de la estabilidad física de SLDI son conformes con los resultados obtenidos en la determinación de la distribución del tamaño de partícula (Tabla 7) donde se observó que a  $t=90$  el tamaño de partícula es ligeramente mayor que a  $t_0$ , indicativo de que ha habido una pequeña agregación de partículas.

Todas las formulaciones resultaron ser fácilmente redispersables a pesar de los fenómenos de flotación o sedimentación. Sin embargo, para lograr una buena redispersión de las partículas y por lo tanto una dosificación correcta y homogénea, la sedimentación es más deseable que la flotación.



**Figura 3.** Backscatering de las suspensiones (a) SpI, (b) SpII, (c) SpIII, (d) SpIV y (e) SLDI

### ***Estabilidad química***

El fenobarbital es un ácido débil con una constante de disociación ácida (pKa) de 7,4 (Roche, 2007), lo que significa que precipitaría a pH por debajo de 8,3. Por otro lado, la furosemida ha demostrado una estabilidad pH-dependiente mostrando una excelente estabilidad a pH alto (Ghanekar y cols., 1978; Shah y cols, 1980). Por ello se utilizó un tampón carbonato/bicarbonato a pH= 10 para la preparación de estas cuatro soluciones.

A  $t_0$  los valores de pH (25 °C) fueron  $8,64 \pm 0,01$ ,  $9,58 \pm 0,01$ ,  $9,20 \pm 0,01$  y  $9,79 \pm 0,01$  para FURI, FURII, PI y PII respectivamente. En estas cuatro soluciones se observó una tendencia a disminuir el pH al aumentar la temperatura. En el caso de las soluciones de furosemida no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores de pH a lo largo del estudio y todos los valores registrados estuvieron dentro del intervalo de aceptación de pH [7-10] establecido en la monografía de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (USP35-NF30). En las dos soluciones de fenobarbital, el estudio estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pero no se consideraron relevantes ya que el pH se mantuvo por encima de 8,3 a lo largo de los 90 días de estudio, lo que permitió al fenobarbital permanecer en solución, no registrándose la aparición de un precipitado.

A  $t_0$ , los valores de pH en las dos formulaciones de sildenafil (SLDI y SLDII) se encuentran alrededor de 4,0, el cual, debido a la presencia del tampón citrato en la fórmula, permanece constante a lo largo de todo el estudio. Este valor de pH se corresponde con el de máxima solubilidad del sildenafil (Sivakranth y cols., 2011). A pesar de que ambas formulaciones se encuentran al pH de mayor solubilidad del sildenafil, la menor concentración de agua presente en el Excipiente para jarabes comparada con la presente en el Excipiente para jarabes sin azúcar, podría dificultar que el sildenafil quede en solución en la fórmula SLDI.

Se realizó un test estadístico *one-way ANOVA* con el objeto de determinar la influencia de la temperatura y del tiempo sobre el pH de estas formulaciones, observándose que no había diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las fórmulas ( $p = 0,7163$  para la Fórmula 1 y  $p = 0,8227$  para la Fórmula 2) en función de la temperatura y sí en función del tiempo ( $P < 0.05$ ) pero estas diferencias no se consideraron relevantes.

En el caso de las suspensiones de espironolactona, el pH de SPIV fue de alrededor de 4,5, que es la pH óptimo de la espironolactona según la bibliografía consultada (Pramar y Gupta, 1991).

Las suspensiones SPI, SPII y SPIII mostraron valores de pH de alrededor de 6,5, probablemente debido a la presencia de sorbato potásico en el jarabe simple (Salgado y cols., 2005). En todos los casos, el pH medido se mantuvo constante al final del estudio. Este hecho coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Salgado y cols., 2005) y muestra que el pH de las suspensiones de espironolactona no se ve afectado por

la temperatura. El pH observado en SPI, SPII y SPIII que está por encima del pH óptimo para la espironolactona no afecta a la cantidad de ingrediente activo presente en las diferentes formulaciones tal y como se verá más adelante.

Las soluciones orales de metadona (MI, MII and MIII) mostraron un pH entre 4.0 y 5.0 independientemente del tiempo y de la temperatura. Igualmente, se estudió la influencia de la temperatura sobre el pH mediante el test one-way ANOVA no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para MI, MII y MIII ( $p = 0.8689$ ;  $0.8690$ ; y  $0.3775$ , respectivamente).

En general, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) suele ser el método de elección para llevar a cabo la **cuantificación de la sustancia activa** en los estudios de estabilidad ya que tiene la capacidad de separar la sustancia activa de los posibles productos de degradación. Sin embargo, en algunos lugares, como en los servicios de farmacia de los hospitales esta técnica puede resultar cara y consume mucho tiempo. Por lo tanto, para cubrir la necesidad de métodos de análisis más rápidos, más simples, más baratos y con un mejor rendimiento, siempre que fue posible, se desarrollaron métodos analíticos alternativos, como la espectroscopia ultravioleta (UV) o la espectrofluorometría, para cuantificar el principio activo en las diferentes formulaciones. Los métodos desarrollados se validaron según la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005) en términos de linealidad, precisión y exactitud, determinando también el límite de detección y el límite de cuantificación. Las diferentes formulaciones se consideraron estables si el contenido de principio activo en la fórmula estaba dentro del intervalo de aceptación  $\pm 10\%$  de la concentración original. La Tabla 8 muestra un resumen de las técnicas seleccionadas así como de la estabilidad de cada principio activo (API) en las diferentes formulaciones.



Principio activo	Técnica analítica	Formulación	Estabilidad del API 4 °C	Estabilidad del API 25 °C	Estabilidad del API 40 °C
Sildenafil	Espectroscopía UV	SLDI	90 días	90 días	60 días
		SLDII	7 días	30 días	30 días
Espironolactona	HPL	SPI	60 días	60 días	60 días
		SPII	60 días	60 días	60 días
		SPIII	60 días	60 días	60 días
		SPIV	60 días	60 días	60 días
Furosemida	Espectrofluorometría	FURI	60 días	60 días	60 días (*)
		FURII	60 días	60 días	15 días (*)
Metadona	Espectroscopía UV	MI	90 días	90 días	90 días
		MII	90 días	90 días	60 días
		MIII	60 días	15 días	7 días
Fenobarbital	Espectroscopía UV	PI	60 días	30 días	7 días
		PII	30 días	7 días	7 días

(\*) Cambio en las características organolépticas a día 7.

**Tabla 8.** Estabilidad del principio activo en las diferentes formulaciones.

En el caso de las formulaciones de sildenafil, para determinar la cantidad de principio activo se utilizó la espectroscopía ultravioleta a 292,5 nm. De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación, el método analítico elegido resultó ser lineal ( $P > 0,05$ ), exacto y preciso para los valores de concentración entre 50  $\mu\text{g/ml}$  y 0,87  $\mu\text{g/ml}$ . El límite de detección fue de  $0,32 \pm 015 \mu\text{g/ml}$  y el límite de cuantificación de  $0,97 \pm 015 \mu\text{g/ml}$ . SLDI se mantuvo por encima del 90% durante 90 días a las temperaturas de 4 °C y 25 °C y durante 60 días a la temperatura de 40 °C. La concentración de sildenafil en SLDII se mantiene estable a 25 y 40 °C hasta  $t=30$ ; sin embargo, a 4 °C se mantiene por encima del 90% hasta  $t=7$ ; a los 15 días la concentración disminuye por debajo del 90% registrándose valores de SLD del 83% a día 30 del estudio. La presencia de un precipitado blanco que permanecía unido al fondo del vial y no redisolvió tras agitación podría explicar el descenso de concentración del principio activo en solución a 4°C a los 15 días del estudio. Este hecho podría ser debido a la disminución de la solubilidad que sufren algunos principios activos a bajas temperaturas ya que, como norma general, temperaturas elevadas incrementan la solubilidad de los sólidos (Abbasi y cols., 2014).

Para la cuantificación de la espironolactona en las cuatro suspensiones estudiadas, el método analítico de elección fue la HPLC con detector UV. Con el objeto de determinar la presencia de canrenona (el principal producto de degradación de la espironolactona)

en las suspensiones, se llevó a cabo un estudio preliminar comparativo a 242 nm (longitud de onda de absorción de la espironolactona) y a 280 nm (longitud de onda de absorción de la canrenona) sobre muestras almacenadas a 70 °C durante 15 días. No se detectaron picos atribuibles a canrenona por lo que la cuantificación de espironolactona durante el estudio de estabilidad se determinó únicamente a 242 nm. El método de HPLC para la cuantificación de la espironolactona en las suspensiones resultó ser lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones entre 25 y 0,78 µg/ml. Los límites de detección y cuantificación fueron  $0,22 \pm 0,26$  µg/ml y  $0,68 \pm 0,79$  µg/ml, respectivamente, lo que confirmó la sensibilidad del método. Los picos correspondientes a los excipientes no interfirieron con el pico debido a la espironolactona (Tiempo de retención=12 minutos) durante todo el estudio, indicando que el método es selectivo en las condiciones establecidas. La homogeneidad de las suspensiones se determinó a  $t_0$  para asegurar que cada vial contenía no menos del 90% y no más del 110 % de la cantidad teórica declarada. Los resultados mostraron que la recuperación media (%) para todas ellas estaba dentro del intervalo aceptable ( $\pm 10\%$  de la cantidad declarada). SPIII mostró el porcentaje de recuperación más bajo y una mayor desviación estándar (%), probablemente debido a su mayor viscosidad que permite que las partículas permanezcan en suspensión más tiempo pero también hacen más difícil la redispersión.

Los resultados analíticos muestran que el contenido de espironolactona de todas las suspensiones se mantuvo por encima del 90% (w/v) de la cantidad original durante todo el estudio, independientemente de la temperatura. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el contenido de la espironolactona para SPI, SPII y spIV entre  $t_0$  y los datos obtenidos al final del estudio. Sin embargo, SPIII registró una variabilidad estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido de espironolactona a las temperaturas de 4 y 25 °C. Esta variabilidad se debe probablemente a la mayor viscosidad a estas temperaturas, lo que podría dificultar el muestreo y la distribución homogénea de la espironolactona en la suspensión. Las temperaturas más altas redujeron la viscosidad de la fórmula, lo que facilitó el muestreo y/o la homogeneidad y por lo tanto a 40 °C, los resultados fueron más constantes. En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la espironolactona es estable en todas las formulaciones estudiadas a 4, 25, y 40 °C durante todo el periodo de estudio.

Para la cuantificación de furosemida en las formulaciones estudiadas, como alternativa al HPLC se utilizó la espectrofluorescencia basada en la fluorescencia nativa de la furosemida en medio ácido. Este hecho podría explicarse por la presencia de un grupo carboxílico no disociado, que podría formar enlaces de hidrógeno intermoleculares con los grupos carboxílicos de otras moléculas de furosemida. Esta unión, que implica la parte de fluoróforo, confiere una rigidez adicional a la molécula de FUR, potenciando así la fluorescencia (Peralta y cols., 2011).

La FUR es más estable a pH básico (Ghanekar y cols., 1978; Shah y cols., 1980), por lo que las muestras de las soluciones orales diluidas preparadas para su análisis por espectrofluorimetría se analizaron inmediatamente después de su preparación y también después de 24 h almacenadas a 4 °C para determinar el efecto del pH sobre las muestras. Se obtuvieron los mismos resultados por lo que el almacenamiento de las muestras a 4 °C en condiciones ácidas no afectó a su estabilidad. Este hecho podría explicarse por el alto grado de dilución. No se observó ninguna precipitación de las muestras.

Una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de FUR se obtuvo en el rango de 0,78 a 0,097 µg/ml. Los límites de detección y cuantificación fueron de  $0,032 \pm 0,01$  µg/ml y  $0,096 \pm 0,01$  µg/ml, respectivamente. El método espectrofluorométrico para la cuantificación de FUR fue selectivo en las condiciones de excitación óptimas, ya que los excipientes no presentaron interferencias con la emisión fluorescente de la FUR.

La cuantificación de FUR por espectrofluorimetría mostró que para la solución FURI, la concentración de FUR al final del estudio se mantuvo dentro del intervalo de aceptación de  $\pm 10\%$  de la concentración original a las tres temperaturas estudiadas. Sin embargo, la concentración de FUR en la solución FURII almacenada a 40 °C estaba fuera del intervalo de aceptación el día 30. Aunque los resultados del análisis de FUR a 40 °C mostraron una concentración de la sustancia activa dentro del intervalo  $\pm 10\%$  de la concentración original, los cambios en el color observados en ambas soluciones (FURI y FURII) a día 7 impide la recomendación de la conservación de las soluciones de FUR por encima de 25 °C. Dada la importancia del color, se debe considerar que cualquier cambio en el mismo podría disminuir la adherencia al tratamiento. Por tanto, la estabilidad de las soluciones FURI y FURII se ha estimado en 60 días cuando se almacena a las temperaturas de 4 y 25°C.

La espectroscopía UV fue el método de elección para la cuantificación de metadona y fenobarbital. Los métodos fueron lineales, precisos y exactos en el intervalo de concentraciones entre 20 y 2,63  $\mu\text{g/ml}$  para la metadona, y entre 50 y 1,96  $\mu\text{g/ml}$  para fenobarbital. El límite de detección fue de  $1.02\pm 0.50$  y de  $0.44\pm 0.28$  para metadona y fenobarbital, respectivamente; el límite de cuantificación resultó ser de  $3.08\pm 1.52$  para la metadona y de  $1.32\pm 0.84$  para el fenobarbital. Estos resultados confirman la sensibilidad de los métodos desarrollados.

Los resultados de los análisis mostraron que el contenido de metadona se mantuvo por encima del 90% (w/v) de la cantidad original a lo largo de 60 días en las tres temperaturas estudiadas para MI; la solución MII fue estable durante 60 días cuando se almacenó a 40 °C y durante 90 días si se almacenaba a 4 y 25 °C. La solución MIII fue estable durante 60 días cuando se almacena a 4 °C, 15 días a 25 °C y 7 días a 40 °C.

En cuanto a la determinación del contenido de fenobarbital, los resultados de los análisis mostraron que el fenobarbital se mantuvo por encima del 90% durante 60 días a 4 °C, durante 30 días a 25 °C y durante 7 días a 40 °C en la solución PI. En caso de solución PII, la concentración de fenobarbital se mantuvo por encima del 90% de la concentración original durante 30 días a 4 °C; y 7 días a 25 y 40 °C.

Puesto que las formulaciones de metadona y fenobarbital mostraron tener una estabilidad más reducida, se realizó la selección del modelo que mejor se ajustaba a los datos experimentales y que por tanto, mejor definía el perfil de degradación de estos dos principios activos.

*Plateau then decay to zero* fue el modelo que mejor se ajustó a los datos para la degradación de MI a las tres temperaturas estudiadas, para MIII a 4 °C, para PI a 4 y 25 °C y para la solución PII a 40 °C. Esta ecuación se utiliza cuando hay una línea de base (en este caso, esta línea se correspondería con la concentración constante de sustancia activa) durante un tiempo y, a continuación, en algún momento, comienza la decadencia. *One phase exponential decay* fue el modelo que mejor se ajustó a los datos de la degradación de la sustancia activa en la solución MII a las tres temperaturas estudiadas, para PII solución a 4 y 25 °C y para la solución de MIII a 25 y 40 °C. En estos casos, la tasa de degradación podría ser proporcional a la concentración del

fármaco en la formulación. A medida que la concentración del principio activo disminuye, también lo hace la velocidad de su degradación.

En general, la degradación de la sustancia activa en las soluciones que se almacenaron a 4 °C sigue el modelo *Plateau then decay to zero*; lo que podría significar que probablemente la presencia de azúcar y la baja temperatura permiten mantener una concentración constante de los principios activos en las soluciones durante más tiempo.

### ***Estabilidad microbiológica***

La contaminación microbiana en las formulaciones líquidas no estériles puede ser causa de mal olor, turbidez, y afectar negativamente al sabor y a la apariencia (Costello et al., 2007; Ghulam et al, 2007). Del mismo modo, un alto nivel de microorganismos puede ser peligroso para la salud, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

Ninguna de las formulaciones estudiadas desde el punto de vista microbiológico presentó contaminación por *E. coli*; el recuento total de bacterias fue inferior a  $10^2$  ufc/g y la contaminación por hongos fue inferior a  $10^1$  ufc/g al final del estudio. Estos resultados indican que todas las formulaciones cumplen con las especificaciones de la Farmacopea Europea y por tanto, son estables desde el punto de vista microbiológico durante todo el estudio.

### ***Estudios biofarmacéuticos***

Con el objeto de determinar si los excipientes podrían ejercer alguna influencia en los procesos de liberación y absorción del principio activo se llevaron a cabo estudios de liberación *in vitro* (ensayos de disolución) con las suspensiones de espironolactona y de absorción *ex vivo* (estudios de absorción a través de intestino delgado de cerdo) con las soluciones de furosemida.

Los **estudios de disolución** tienen una gran importancia, ya que, en la mayoría de los casos, la disolución del fármaco es el paso limitante de la velocidad en el proceso de absorción. Como ocurre con las formas de dosificación sólidas orales, los sistemas dispersos heterogéneos (suspensiones) también podrían presentar algunos problemas con la disolución *in vitro* (Gonzalez-Vidal y cols., 2008). Por lo tanto, se realizó el ensayo de disolución de las suspensiones y los resultados obtenidos se compararon con

los perfiles de disolución de los comprimidos disponibles comercialmente (25 mg de espironolactona).

Los ensayos de disolución *in vitro* han sido reconocidos como un elemento importante en el desarrollo de fármacos, y bajo ciertas condiciones, pueden ser utilizados como un potencial marcador sustituto de los estudios de bioequivalencia (Costa y cols., 2001; Gowthamarajan y Singh, 2010).

Este estudio comparativo aún no ha sido reportado en la literatura, pero es muy importante, ya que la composición de las suspensiones podría modificar el tiempo de disolución y afectar a la velocidad de absorción de la sustancia activa. El método espectrofotométrico UV utilizado para cuantificar la espironolactona en el ensayo de disolución fue lineal, exacto, y preciso sobre un intervalo de concentraciones de 1,56 a 25 mg / ml. Los límites de detección y cuantificación fueron de  $0,19 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$  y  $0,60 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Los ensayos de liberación del fármaco *in vitro* revelaron que SPI, SPII y SPIV se disuelven casi de inmediato. Sin embargo, este no fue el caso para SPIII, que tardó alrededor de 10 minutos en alcanzar la concentración máxima de la sustancia activa. Por este motivo, se compararon los perfiles de disolución de SPIII y los comprimidos comercializados. El retraso en la liberación de la espironolactona en SPIII podría ser debido a la presencia de CMC, junto con jarabe simple. Por lo tanto, la presencia de estos excipientes podría conducir a variaciones en la velocidad de absorción de la espironolactona en esta fórmula.

Se utilizaron tres modelos cinéticos (*one-phase exponential association*, *two-phase association* y *Boltzman sigmoid*) para ajustar los datos experimentales de liberación del fármaco. También se estudiaron parámetros independientes del modelo como la eficiencia de la disolución (DE) y el tiempo medio de disolución (MDT), valores útiles para la comparación de perfiles de disolución, ya que estos parámetros no están condicionados por la bondad del ajuste de un modelo teórico a los datos experimentales (Sierra-Villar y cols., 2012).

Los resultados muestran que como era de esperar, MDT fue mayor y DE fue menor para los comprimidos que para la suspensión.

El criterio utilizado para seleccionar el modelo que estadísticamente describe mejor el mecanismo de liberación del fármaco fue el valor más bajo de AIC (criterio de Akaike) y el coeficiente de correlación de regresión lineal más alto ( $r^2$ ).

Para SPIII, el modelo que mejor se ajustó a los datos fue el *Boltzmann sigmoid*. En general, el modelo de Boltzmann se utiliza para simular el transporte y la reacción de los fluidos en medios porosos (Kang y cols., 2002; Chen y Zhang, 2009). En este caso, el polímero (CMC) probablemente realiza una función similar a las matrices porosas y, por lo tanto, presenta el mismo mecanismo. Otros autores (Chen y Zhang, 2009) utilizan el modelo de Boltzmann para simular la disolución de gotas líquidas inmiscibles en otro líquido durante el proceso resultante de la flotabilidad.

Para los comprimidos, el modelo *two-phase association* es el que mejor se ajustó a los datos experimentales. Este modelo se utiliza cuando el resultado obtenido es el resultado de la suma de un decaimiento exponencial rápido y luego uno más lento. En nuestro caso, esto podría ser debido a la disolución rápida de la película de recubrimiento de los comprimidos al comienzo del estudio y una desintegración lenta posterior debido a los excipientes (sulfato de calcio o almidón de maíz) que limita el proceso de disolución (referencia).

Los perfiles de disolución medios ( $n=6$ ) tanto para SPIII como para los comprimidos se muestran en la Figura 4.

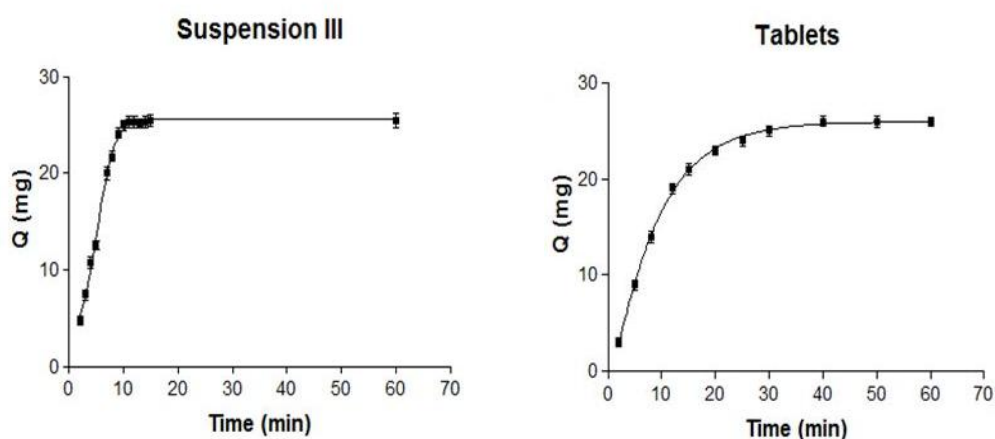


Figura 4. Perfiles de disolución de SPIII y los comprimidos comercializados.

Con objeto de determinar si los excipientes presentes en la formulación podrían ejercer alguna influencia en los procesos de absorción, se realizó un **estudio de absorción de**

**las soluciones de furosemida a través de intestino delgado de cerdo.** El método utilizado para determinar la cantidad absorbida de furosemida fue la espectrofluorometría, método utilizado previamente para la cuantificación de este principio activo en muestras biológicas por su alta sensibilidad. La elección de esta membrana fue debida a su similitud con el intestino humano. El estudio se llevó a cabo en células de difusión de Franz. El medio receptor fue tampón fosfato salino (PBS) que es un medio biocompatible y que permite mantener las condiciones sink durante todo el experimento.

Para comprobar que nuestro método era válido, el estudio se realizó en primer lugar con una solución de FUR en PBS (pH=7,4) y los resultados se compararon con los reportados en la literatura para el ensayo de absorción realizado con células Caco-2. Los resultados obtenidos en nuestro estudio de permeabilidad utilizando intestino delgado ( $P_{eff} = 0,46 \times 10^{-6}$  cm/s) resultaron ser muy similares a los reportados cuando se utilizan células Caco-2 ( $P_{eff} = 0,1-0,5 \times 10^{-6}$  cm/s) (Granero y cols., 2010). Por lo tanto, nuestro método se consideró válido para este propósito.

Los perfiles de absorción de la FUR a través de intestino delgado de cerdo fueron los perfiles típicos de estado estacionario. Después de un tiempo de retardo de aproximadamente 30 minutos, se observó una relación casi lineal entre las cantidades acumulativas del fármaco permeado en función del tiempo, lo que indica que la integridad del intestino de cerdo se mantuvo durante todo el experimento y que las velocidades de permeación fueron constantes. El perfil de absorción medio para la solución FURI en función del tiempo así como el valor del  $P_{eff}$  ( $2,5 \times 10^{-6}$  cm/s) fue mayor que el de la Solución II ( $P_{eff} = 0,208 \times 10^{-7}$  cm/s). La permeación es un proceso escalonado multifactorial; en nuestro estudio todos los factores eran iguales excepto los excipientes presentes en ambas soluciones. Este hecho coincide con lo expuesto en la literatura de forma que la permeabilidad de la FUR puede verse afectada por algunos excipientes (Granero y cols., 2010). En nuestro caso, la presencia de goma de xantana en la solución II podría crear una matriz que dificultase el contacto de la furosemida con las microvellosidades intestinales.

Los datos obtenidos muestran la utilidad del modelo ex vivo utilizado para estimar la absorción de la furosemida desde dos jarabes de uso pediátrico. Los resultados también



sugieren la capacidad del método para discriminar entre formulaciones que exhiben mayor o menor absorción.

# **CAPÍTULO V.**

## **CONCLUSIONES**

---



El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, la caracterización y el estudio de estabilidad a tres temperaturas (4, 25 y 90°C) y durante un periodo máximo de 90 días, de fórmulas magistrales líquidas de uso oral, a partir de polvo puro, aptas para uso pediátrico así como para personas que, por un motivo o por otro, tienen dificultades para deglutir. Se han estudiado un total de trece fórmulas magistrales: dos fórmulas de sildenafil (SLD I y SLD II), cuatro de espironolactona (SP I, SP II, SP III y SP IV), dos de furosemida (FUR I y FUR II), tres de metadona (MI, MII y MIII) y dos de fenobarbital (PI y PII). En el desarrollo de las formulaciones también se ha tenido en cuenta a la población diabética.

En base a los resultados obtenidos, se concluyen las siguientes consideraciones:

- De las formulaciones de sildenafil, la fórmula SLDI resultó ser una suspensión estable durante 90 días a 4 y 25 °C, mientras que a 40°C, la concentración del principio activo (API) se mantuvo constante dentro de los límites aceptables hasta el día 60 del estudio. La solución SLDII (apta para la población diabética) se mantuvo estable durante 30 días a 25 y 40 °C, sin embargo, a 4°C, se registraron valores de la concentración de API por debajo del 90% a día 15. Los valores de pH no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones ensayadas y el comportamiento reológico se mantuvo constante en ambas formulaciones. Las fórmulas resultaron ser estables también desde un punto de vista microbiológico.
- Las cuatro suspensiones de espironolactona mantuvieron la concentración del principio activo por encima del 90% de la concentración original a día 60 independientemente de la temperatura. El pH y el comportamiento reológico también se mantuvieron constantes a lo largo del estudio. La fórmula más sencilla de las cuatro, SPI conteniendo jarabe simple como único vehículo, es la que registró el mayor tamaño de partícula mostrando un fenómeno de flotación. Los resultados obtenidos sugieren que SPIII es la menos adecuada debido a su elevada dificultad de redispersión y consecuente dificultad para conseguir una correcta uniformidad de contenido. La liberación de espironolactona desde SPIII fue la más lenta indicando que la presencia de algunos excipientes podría tener un impacto en el perfil de disolución de las suspensiones. Por tanto, en función

de sus características y en base a los resultados obtenidos, se podría concluir que SP IV es la más adecuada de las cuatro.

- Los estudios revelan que la furosemida se mantuvo estable a 4 y 25 °C durante 60 días en las dos soluciones (una de ellas apta para diabéticos). Los cambios de color observados en las muestras de ambas soluciones conservadas a 40 °C a partir del día 7, conducen a recomendar el almacenamiento de estas soluciones por debajo de 25 °C. El método espectrofluorométrico utilizado resultó ser lineal, exacto, preciso y adecuado para la cuantificación de la furosemida en las soluciones orales a lo largo del estudio de estabilidad. En ambas soluciones la presencia de tampón carbonato/bicarbonato garantizó un pH básico constante a lo largo del estudio, permitiendo así que la furosemida permaneciera en solución. Las propiedades reológicas de las dos soluciones también se mantuvieron estables durante 60 días a las tres temperaturas ensayadas, y ambas fueron también microbiológicamente estables. El estudio de absorción de las soluciones de furosemida a través de intestino delgado de cerdo, reveló que la solución FUR I mostró un perfil de absorción más alto, probablemente debido al contenido de goma xantana en la solución FUR II.
- Respecto a la metadona se puede concluir que la solución MI resultó ser estable desde un punto de vista fisicoquímico durante 60 días en las tres temperaturas estudiadas; MII durante 90 días a 4 y 25 °C y 60 días cuando se almacena a 40 °C; y MIII durante 60 días si se almacena a 4 °C, 15 días a 25 °C y 7 días a 4 °C. Se estudió el perfil de degradación del principio activo en las soluciones identificando el modelo estadístico que mejor se ajustaba a los datos experimentales. Los resultados obtenidos también sugieren que el pH no mostró diferencias estadísticamente significativas con las condiciones ensayadas de las tres soluciones estudiadas de metadona. El comportamiento reológico también se mantuvo constante en todas las formulaciones.
- En cuanto a las soluciones de fenobarbital, PI fue estable durante 60 días a 4 °C y 30 días a 25 °C. La solución PII, se mantuvo estable sólo durante 7 días a 4 y 25 °C. Cambios en el color que se muestra en las soluciones de fenobarbital cuando se almacenan a 40 °C, conducen a recomendar el almacenamiento de las soluciones por debajo de 25 °C. También se estudió el modelo estadístico que mejor describía la degradación del fenobarbital en las dos soluciones. A pesar de encontrar diferencias

significativas en los datos del pH de las soluciones de fenobarbital, estos valores permiten mantener el fenobarbital en solución a lo largo del estudio. El comportamiento reológico también permaneció constante en todas las formulaciones.

Todos estos hallazgos hacen posible una correcta conservación y dosificación de los principios activos: sildenafil, espironolactona, furosemida, metadona y fenobarbital cuando se formulan en formas líquidas de administración oral; garantizando la continuidad, calidad y eficacia de tratamientos pediátricos tales como la hipertensión pulmonar persistente del neonato, la insuficiencia cardíaca congestiva, el síndrome de abstinencia neonatal y las convulsiones neonatales, según corresponda.



## **CAPÍTULO VI.**

### **BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL**

---





Abbasi M, Martinez F, Jouyban A, and A Jouyban . "Prediction of Deferiprone Solubility in Aqueous Mixtures of Ethylene Glycol, Propylene Glycol and Polyethylene Glycol 400 at Various Temperatures." *Journal of Molecular Liquids*. 197 (2014): 171-175.

Acocella G. "Clinical Pharmacokinetics of Rifampicin." *Clinical Pharmacokinetics*. 3.2 (1978): 108-27.

Agyralides GG, Dallas PP, and DM Rekkas. "Development and in vitro evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques". *International Journal of Pharmaceutics*. 281.1 (2004): 35-43.

Alcorn J, and PJ McNamara. "Ontogeny of Hepatic and Renal Systemic Clearance Pathways in Infants: Part Ii." *Clinical Pharmacokinetics*. 41.13 (2002): 1077-94.

Allen LV. "Dosage Form Design and Development." *Clinical Therapeutics*. 30.11 (2008): 2102-2111.

American Academy of Pediatrics. "Alternative Routes of Drug Administration - Advantages and Disadvantages (subject Review) - Committee on Drugs." *Pediatrics*. 100.1 (1997): 143-152.

Anderson GD, and AM Lynn. "Optimizing Pediatric Dosing: a Developmental Pharmacologic Approach." *Pharmacotherapy*. 29.6 (2009): 680-90.

Andrews RE, Fenton MJ, Ridout DA, and M Burch. "New-onset Heart Failure Due to Heart Muscle Disease in Childhood: a Prospective Study in the United Kingdom and Ireland." *Circulation*. 117.1 (2008): 79-84.

Asiri YA, Bawazir SA, Al-Hadiya BM, Gubara OA and KI Al-Khamis. "Stability of Extemporaneously Prepared Spironolactone Suspensions in Saudi Hospitals." *Saudi Pharmaceutical Journal*. 9 (2001): 106-112.

Balboa de Paz F, and S Rueda. "Características farmacocinéticas de los fármacos en la edad pediátrica". *Actualidad en Farmacología y Terapéutica*. 2.2 (2004): 89-98.

Baldrick P. "Developing Drugs for Pediatric Use: a Role for Juvenile Animal Studies?" *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39.3 (2004): 381-389.

Barrington KJ, and NN Finer. "Inhaled nitric oxide for respiratory failure in preterm infants." *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 4 (2001).

Bartelink IH, CM Rademaker, AF Schobben, and Van den Anker JN. "Guidelines on Paediatric Dosing on the Basis of Developmental Physiology and Pharmacokinetic Considerations." *Clinical Pharmacokinetics*. 45.11 (2006): 1077-97.

Beckman DA, and M Feuston. "Landmarks in the Development of the Female Reproductive System." *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 68.2 (2003): 137-143.

Bhargava HN, Nicolai DW and BJ Oza. "Topical suspensions". In: Lieberman A, Rieger MM and GS Banker (Eds.). *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*. Marcel Dekker, New York. (1996) 202-224.

Bio LL, Siu A, and CY Poon. "Update on the Pharmacologic Management of Neonatal Abstinence Syndrome." *Journal of Perinatology*. 31.11 (2011): 692-701.

Bjerre I and E Corelius. Benign familial neonatal convulsions. *Acta Paediatrica*. 57.6 (1968): 557-561.

Bjorkman S. "Prediction of Drug Disposition in Infants and Children by Means of Physiologically Based Pharmacokinetic (pbpk) Modelling: Theophylline and Midazolam As Model Drugs." *British Journal of Clinical Pharmacology*. 59.6 (2005): 691-704.

Blume HK, Garrison MM, and DA Christakis. "Neonatal Seizures: Treatment and Treatment Variability in 31 United States Pediatric Hospitals." *Journal of Child Neurology*. 24.2 (2009): 148-54.

Boehm G, Braun W, Moro G, and I Minoli. "Bile Acid Concentrations in Serum and Duodenal Aspirates of Healthy Preterm Infants: Effects of Gestational and Postnatal Age." *Biology of the Neonate*. 71.4 (1997): 207-14.

Brazy PC, and RB Gunn. "Furosemide Inhibition of Chloride Transport in Human Red Blood Cells." *The Journal of General Physiology*. 68.6 (1976): 583-99.

Brion F, Nunn AJ, and A Rieutord. "Extemporaneous (magistral) Preparation of Oral Medicines for Children in European Hospitals." *Acta Paediatrica*. 92.4 (2003): 486-490.

Buck ML. "Clinical Experience with Spironolactone in Pediatrics." *The Annals of Pharmacotherapy*. 39.5 (2005): 823-828.

Buck ML. Sildenafil for the treatment of pulmonary hypertension in children. *Pediatric Pharmacotherapy*. 10.2 (2004).

Burri P. "Structural Aspects of Prenatal and Postnatal Development and Growth of the Lung". In: Lung Growth and Development, Ed. JA McNoald, Marcel Dekker, Inc., New York (1997): 1- 35.

Butler DR, Kuhn RJ, and MH Chandler. "Pharmacokinetics of Anti-Infective Agents in Paediatric Patients." *Clinical Pharmacokinetics*. 26.5 (1994): 374-95.

Cabral JEB, and J Belik. "Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: Recent Advances in Pathophysiology and Treatment." *Jornal De Pediatria*. 89.3 (2013): 226-242.

Cancela MA, Álvarez E, and R. Maceiras. "Effects of Temperature and Concentration on Carboxymethylcellulose with Sucrose Rheology." *Journal of Food Engineering*. 71.4 (2005): 419-424.

Cassin S, Tyler T, and R Wallis. "The Effects of Prostaglandin E on Fetal Pulmonary Vascular Resistance (38588)." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (new York, N.y.). 148.2 (1975): 584-7.

Cazeneuve C, Pons G, Rey E, Treluyer JM, Cresteil T, Thiroux G, D'Athis P, and G Olive. "Biotransformation of Caffeine in Human Liver Microsomes from Foetuses, Neonates, Infants and Adults." *British Journal of Clinical Pharmacology*. 37.5 (1994): 405-412.

CDER 2006. Guidance for industry- Nonclinical safety evaluation of pedatric Drug Products. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). February 2006.

CDER, 2009. Oral Solutions and Suspensions (8/94); Guide to Inspections; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2009).

Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, and M Fresta. "Turbiscan Lab Expert Analysis of the Stability of Ethosomes and Ultradeformable Liposomes Containing a Bilayer Fluidizing Agent." *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 72.1 (2009): 155-60.

Chae KM, and D Michael. Tharp. "Use and Safety of Antihistamines in Children." *Dermatologic Therapy*. 13.4 (2000): 374-383.

Chen, C, and D Zhang. "Lattice Boltzmann Simulation of the Rise and Dissolution of Two-Dimensional Immiscible Droplets." *Physics of Fluids*. 21.10 (2009).

Conroy S, and J McIntyre. "The Use of Unlicensed and Off-Label Medicines in the Neonate." *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 10.2 (2005): 115-122.

Costa P, and Sousa Lobo JM. "Modeling and Comparison of Dissolution Profiles." *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13.2 (2001): 123-133.

Costello I, Long PF, Wong IK, Tuleu C, and Yeung V. *Paediatric drug handling*. Pharmaceutical Press, Cornwall (2007).

Cross M. "Rheology of Non-Newtonian Fluids: a New Flow Equation for Pseudoplastic Systems." *Journal of Colloid Science*. 20.5 (1965): 417-437.

D'Apolito K. "Neonatal Opiate Withdrawal: Pharmacologic Management." *Newborn and Infant Nursing Reviews*. 9.1 (2009): 62-69.

de Wildt SN, Johnson TN, and I Choonara. "The Effect of Age on Drug Metabolism." *Paediatric and Perinatal Drug Therapy*. 5.3 (2003): 101-106.

Djabri A, Richard HG, and MB Delgado-Charro. "Passive and Iontophoretic Transdermal Delivery of Phenobarbital: Implications in Paediatric Therapy." *International Journal of Pharmaceutics*. 435.1 (2012): 76-82.

Doberczak TM, Kandal SR, and I Wilets. "Neonatal Opiate Abstinence Syndrome in Term and Preterm Infants." *The Journal of Pediatrics*. 118.6 (1991): 933-937.

Ebner N, Rohrmeister K, Winklbaier B, Baewert A, Jagsch R, Peternell A, Thau K, and G Fischer. "Management of Neonatal Abstinence Syndrome in Neonates Born to Opioid Maintained Women." *Drug and Alcohol Dependence*. 87 (2007): 131-138.

EMA, 2006. Regulation (EC) N° 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004.

EMCDDA, 1996. *Annual Report on the State of the Drugs Problem in the European Union*. Lisboa, Portugal: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (1996).

Engelbrecht AL. "Sildenafil in the Management of Neonates with PPHN: a Rural Regional Hospital Experience: Case Report." *South African Journal of Child Health*. 2.4 (2008): 166-169.

EPAR Revatio, 2012.

[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000638/human\\_med\\_001033.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000638/human_med_001033.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). (Accedido Junio 2014).

European Commission, 2008. Guideline on the format and content of applications for agreement or modification of a paediatric investigation plan and request for waivers or deferrals and concerning the operation of the compliance check and on criteria for assessing significant studies. 2008/C 243/01.

FDA, 2009.

<http://www.fda.gov/iceci/inspections/inspectionguides/ucm074935.htm>.

(Accedido Junio 2014)

Fernandez E, R Perez, A Hernandez, P Tejada, M Arteta, and JT Ramos. "Factors and Mechanisms for Pharmacokinetic Differences between Pediatric Population and Adults." *Pharmaceutics*. 3.1 (2011): 53-72.

Ferry AL, Hort J, Mitchell JR, Cook DJ, Lagarrigue S, and B Valles Pamies. "Viscosity and Flavour Perception: Why Is Starch Different from Hydrocolloids?" *Food Hydrocolloids*. 20.6 (2006): 855-862.

Finnegan LP, Kron RE, Connaughton JF, and JP Emich. "Assessment and Treatment of Abstinence in the Infant of the Drug-Dependent Mother." *International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy*. 12 (1975): 1-2.

Finnegan LP. "Addiction and pregnancy: maternal and child issues". In: Tagliamonte A, and I Maremani (Eds.), *Drug Related Clinical Problems*. Springer, Vienna. (1995): 137-147.

Fister P, Soltirovska-Salamon A, Debeljak M, and D Paro-Panjan. "Benign Familial Neonatal Convulsions Caused by Mutation in *Kcnq3*, Exon 6: a European Case." *European Journal of Paediatric Neurology: Ejpnp: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*. 17.3 (2013): 308-10.

Foye WO, Lemke T and DA Williams. *Principles of medicinal chemistry*, 4th edn. Williams and Wilkins, USA. (1995).

Ghanekar AG, Das Gupta V and CW Gibbs Jr. "Stability of Furosemide in Aqueous Systems." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 67.6 (1978): 808-811.

Ghulam A, Keen K, Tuleu C, Wong ICK, and PF Long. "Poor preservation efficacy versus quality and safety of pediatric extemporaneous liquids." *The Annals of Pharmacotherapy*. 41 (2007): 857-860.

Giebisch G. "The use of a diuretic agent as a probe to investigate site and mechanism of ion transport process." *Arzneimittelforschung*. 35 (1985): 336-342.

Ginsberg G, Hattis D, Miller R, and B Sonawane. "Pediatric Pharmacokinetic Data: Implications for Environmental Risk Assessment for Children." *Pediatrics*. 113.4 (2004): 973-83.

Glass BD, and A Haywood. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutica Science*. 9 (2006): 398-426.

Goldman AP, Tasker RC, Haworth SG, Sigston PE, and DJ Macrae. "Four Patterns of Response to Inhaled Nitric Oxide for Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn." *Pediatrics*. 98.4 (1996): 706-13.

Gonzalez Vidal NL, Zubata PD, Simionato LD, and MT Pizzorno. "Dissolution Stability Study of Cefadroxil Extemporaneous Suspensions." *Dissolution Technologies*. 15.3 (2008): 29-36.

Gonzalez-Mira E, Egea MA, Garcia ML, and EB Souto. "Design and Ocular Tolerance of Flurbiprofen Loaded Ultrasound-Engineered Nlc." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 81.2 (2010): 412-421.

Govantes-Betes J, Estes-Govantes C, and P Velázquez-Lorenzo. *Manual Normon*. Madrid: Laboratorios Normon, 2006.

Gowthamarajan K, and SK Singh. "Dissolution Testing for Poorly Soluble Drugs: a Continuing Perspective." *Dissolution Technologies*. 17.3 (2010): 24-32.

Granero GE, Longhi MR, Mora MJ, Junginger HE, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, and DM Barends. "Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Furosemide." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99.6 (2010): 2544-2556.

Heubi JE, Balistreri WF, and FJ Suchy. "Bile Salt Metabolism in the First Year of Life." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 100.1 (1982): 127-36.

Hobbins SM, Fowler RS, Rowe RD, and AG Korey. "Spironolactone Therapy in Infants with Congestive Heart Failure Secondary to Congenital Heart Disease." *Archives of Disease in Childhood*. 56.12 (1981): 934-938.

Holladay SD and R Smialowicz. "Development of the Murine and Human Immune System: Different Effects of Immunotoxicants Depend on Time of Exposure." *Environ Health Perspect.* 108 (2000): 463-473.

Hrastovec A, Hostnik T, and D Neubauer. "Benign Convulsions in Newborns and Infants: Occurrence, Clinical Course and Prognosis." *European Journal of Paediatric Neurology.* 16.1 (2012): 64-73.

Hudak ML, and RC Tan. "The Committee on drugs and the committee on fetus and newborn. Neonatal Drug Withdrawal". *Pediatrics.* 129.2 (2012): e540 -e560.

Hunt A, Joel S, Dick G, and A Goldman. "Population Pharmacokinetics of Oral Morphine and Its Glucuronides in Children Receiving Morphine As Immediate-Release Liquid or Sustained-Release Tablets for Cancer Pain." *The Journal of Pediatrics.* 135.1 (1999): 47-55.

ICH, 2000. *Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population E 11* <http://www.ich.org> (accessed 24.06.14).

ICH, 2005. *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1); ICH Harmonised Tripartite Guideline: Geneva, Switzerland (2005).*

James A. The legal and clinical implications of crushing tablet medication. *Nursing Times* 100.50 (2005): 28-29.

Johnson K, Gerada C and A Greenough. "Treatment of neonatal abstinence syndrome." *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition.* 88.1 (2003): 2-5.

Kang Q, Zhang D, Chen S, and He X. "Lattice Boltzmann Simulation of Chemical Dissolution in Porous Media." *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics.* 65.3 (2002).

Kantor PF, Abraham JR, Dipchand AI, Benson LN, and AN Redington. "The Impact of Changing Medical Therapy on Transplantation-Free Survival in Pediatric Dilated Cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology.* 55.13 (2010): 1377-1384.

Kantor PF, Loughheed Dancea A, McGillion M, Barbosa N, Chan C, Dillenburg R, Atallah J, Buchholz H, Chant-Gambacort C, Conway J, Gardin L, George K, Greenway S, Human DG, Jeewa A, Price JF, Ross RD, Roche SL, Ryerson L, Soni R, Wilson J, and K Wong. "Presentation, Diagnosis, and Medical Management of Heart Failure in



Children: Canadian Cardiovascular Society Guidelines." *The Canadian Journal of Cardiology*. 29.12 (2013): 1535-52.

Kay JD, Colan SD, and TPJ Graham. "Congestive Heart Failure in Pediatric Patients." *American Heart Journal*. 142.5 (2001): 923-8.

Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, and RE Kauffman. "Developmental Pharmacology-Drug Disposition, Action, and Therapy in Infants and Children." *The New England Journal of Medicine*. 349.12 (2003): 1157-67.

Keller RL, Moore P, Teitel D, Hawgood S, McQuitty J, and JR Fineman. "Abnormal Vascular Tone in Infants and Children with Lung Hypoplasia: Findings from Cardiac Catheterization and the Response to Chronic Therapy." *Pediatric Critical Care Medicine: a Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 7.6 (2006): 589-94.

Kinsella JP, and SH Abman. "Inhaled Nitric Oxide: Current and Future Uses in Neonates." *Seminars in Perinatology*. 24.6 (2000): 387-395.

Koren G. "Therapeutic Drug Monitoring Principles in the Neonate. National Academy of Clinical Biochemistry." *Clinical Chemistry*. 43.1 (1997): 222-7.

Kulshreshtha, Alok K, Onkar N. Singh, and G M. Wall. *Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing*. New York: Springer, 2010.

Kurz H, Michels H, and HH Stickel. "Differences in the Binding of Drugs to Plasma Proteins from Newborn and Adult Man. Ii." *European Journal of Clinical Pharmacology*. 11.6 (1977): 469-72.

Lee CH, Moturi V, and Y Lee. "Thixotropic Property in Pharmaceutical Formulations." *Journal of Controlled Release*. 136.2 (2009): 88-98.

Leffler CW, Hessler JR, and RS Green. "The onset of breathing at birth stimulates pulmonary vascular prostacyclin synthesis." *Pediatric Research*. 18 (1984): 938-42.

Lehr VT. "Anticonvulsants." In: Yaffe, S.J., Aranda, J.V. (Eds.), *Neonatal and Pediatric Pharmacology: Therapeutic Principles in Practice*. , third ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, London. (2005): 504-519.

Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, Costantini D, and R Gref. "Study of Emulsion Stabilization by Graft Copolymers Using the Optical Analyzer Turbiscan." *International Journal of Pharmaceutics*. 254.1 (2003): 77-82.

Lipsitz PJ. "A Proposed Narcotic Withdrawal Score for Use with Newborn Infants: a Pragmatic Evaluation of Its Efficacy." *Clinical Pediatrics*. 14.6 (1975): 592-594.

Lowary TL and GN Richards. "Effects of impurities on hydrolysis of sucrose in concentrated aqueous solutions." *International Sugar Journal* (1998) 90(1077): 164-167.

Malgor LA, and Valsecia ME. "Farmacología médica". *Farmacocinética y farmacodinamia en pediatría*. Base de datos: cátedra farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, República Argentina. 4.4 (2000)

Martin A. "Physical pharmacy." Lea & Febiger, Philadelphia. (1993)

Marty MS, Chapin RE, Parks LG, and BA Thorsrud. "Development and Maturation of the Male Reproductive System." *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 68.2 (2003): 125.

McCracken GHJ, Ginsburg CM, Clahsen JC, and ML Thomas. "Pharmacologic Evaluation of Orally Administered Antibiotics in Infants and Children: Effect of Feeding on Bioavailability." *Pediatrics*. 62.5 (1978): 738-43.

McLeod HL, Relling MV, Crom WR, Silverstein K, Groom S, Rodman JH, Rivera GK, Cris WMT, and WE Evans. "Disposition of Antineoplastic Agents in the Very Young Child." *The British Journal of Cancer*. Supplement. 18 (1992): 23-9.

Meissner HC, and AL Smith. "The Current Status of Chloramphenicol." *Pediatrics*. 64.3 (1979): 348-56.

Morselli PL, Franco-Morselli R, and L Bossi. "Clinical Pharmacokinetics in Newborns and Infants. Age-Related Differences and Therapeutic Implications." *Clinical Pharmacokinetics*. 5.6 (1980): 485-527.

Noerr B. "Spironolactone". *Neonatal Network*. 18 (1999): 43-46.

Noori S, Friedlich P, Wong P, Garingo A, and I Seri. "Cardiovascular effects of sildenafil in neonates and infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension." *Neonatology*. 91 (2007): 92-100.

Ofner CM, Schnaare RL and JB Schwartz. "Reconstitutable oral suspensions". In: Lieberman HA, Rieger MM and Banker GS. (Eds.). *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*. Marcel Dekker, New York. (1996) 247-249.

O'Grady MJ, Hopewell J, and MJ White. "Management of Neonatal Abstinence Syndrome: a National Survey and Review of Practice." *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 94.4 (2009): 249–252.

One Hundred Twelfth Congress of the United States of America, 2012. <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/BILLS-112s3187enr/pdf/BILLS-112s3187enr.pdf>. (Accedido Junio 2014)

Patsalos PN. "Clinical Pharmacokinetics of Levetiracetam." *Clinical Pharmacokinetics*. 43.11 (2004): 707-724.

Peralta CM, Fernandez LP and NA Masi. "Solid Phase Extraction Using Nylon Membranes with Fluorescence Detection As a Fast and Sensitive Method for Amiloride and Furosemide Determination in Urine Samples." *Microchemical Journal*. 98.1 (2011): 39-43.

Pramar Y, and VD Gupta. "Preformulation Studies of Spironolactone: Effect of Ph, Two Buffer Species, Ionic Strength, and Temperature on Stability." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 80.6 (1991): 551-553.

Quintas MAC, Brandão TRS and CLM Silva. "Modelling colour changes during the caramelisation reaction." *Journal of Food Engineering*. 83.4 (2007): 483-491.

Rane A, and JT Wilson. "Clinical Pharmacokinetics in Infants and Children." *Clinical Pharmacokinetics*. 1.1 (1976): 2-24.

Real Decreto 175/2001, de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales. (2001).

Rhodin M, Anderson B, Peters A, Coulthard M, Wilkins B, Cole M, Chatelut E, Grubb A, Veal G, Keir M, and N Holford. "Human Renal Function Maturation: a Quantitative Description Using Weight and Postmenstrual Age." *Pediatric Nephrology*. 24.1 (2009): 67-76.

Rice D, and S Barone Jr. "Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models" *Environmental Health Perspectives*, 108.3 (2000): 511-533.

Roche VF. "Improving Pharmacy Students' Understanding and Long-Term Retention of Acid-Base Chemistry." *American Journal of Pharmaceutical Education*. 71.6 (2007).

Ross RD, Bollinger RO, and WW Pinsky. "Grading the Severity of Congestive Heart Failure in Infants." *Pediatric Cardiology*. 13.2 (1992): 72-75.

Rossano JW, Kim JJ, Decker JA, Price JF, F Zafar, Graves DE, Morales DL, Heinle JS, Bozkurt B, Towbin JA, Denfield SW, Dreyer WJ, and JL Jefferies. "Prevalence, Morbidity, and Mortality of Heart Failure-Related Hospitalizations in Children in the United States: a Population-Based Study." *Journal of Cardiac Failure*. 18.6 (2012): 459-70.

Routledge PA. "Pharmacokinetics in Children." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 34 (1994): 19-24.

Rubia YB, Firoz S, Chandra Mouli Y, Vikaram A, Mahitha B, and U Aruna. Preparation and evaluation of oral fast dissolving films of citalopram hydrobromide. *International Journal of Biopharmaceutics*. 3.2 (2012): 103-106.

Salgado AC, Rosa ML, Duarte MA and AJ Almeida. "Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations." *European Journal of Hospital Pharmacy Science Practice*. 11.3 (2005): 68-73.

Santovena A, Hernandez-Paiz Z, and JB Farina. "Design of a Pediatric Oral Formulation with a Low Proportion of Hydrochlorothiazide." *International Journal of Pharmaceutics*. 423.2 (2012): 360-364.

Sarkar S, and SM Donn. "Management of Neonatal Abstinence Syndrome in Neonatal Intensive Care Units: a National Survey." *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*. 26.1 (2006): 15-7.

Schellart WP. "Rheology and Density of Glucose Syrup and Honey: Determining Their Suitability for Usage in Analogue and Fluid Dynamic Models of Geological Processes." *Journal of Structural Geology*. 33.6 (2011): 1079-1088.

Shah KA, Das Gupta V and KR. Stewart. "Effect of Ph, Chlorobutanol, Cysteine Hydrochloride, Ethylenediaminetetraacetic Acid, Propylene Glycol, Sodium Metabisulfite, and Sodium Sulfite on Furosemide Stability in Aqueous Solutions." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69.5 (1980): 594-596.

Shah PS, and A Ohlsson. "Sildenafil for Pulmonary Hypertension in Neonates." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (2011).

Sierra Villar AM, Clares Naveros B, Calpena Campmany AC, Aróztegui Trenchs M, Barbé Rocabert C, and L Halbaut Bellowa. "Design and Optimization of Self-

Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (snedds) for Enhanced Dissolution of Gemfibrozil." *International Journal of Pharmaceutics*. 431 (2012): 161-175.

Simmonds J, Franklin O, and M Burch. "Understanding the Pathophysiology of Paediatric Heart Failure and Its Treatment." *Current Paediatrics*. 16.6 (2006): 398-405.

Sivakranth M, Althaf AS, and S Rajasekhar. "Formulation and Evaluation of Oral Fast Dissolving Tablets of Sildenafil Citrate." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3 (2011): 112-121.

Sivakranth M, Althaf AS, and S Rajasekhar. "Formulation and Evaluation of Oral Fast Dissolving Tablets of Sildenafil Citrate." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3 (2011): 112-121.

Skinner AV. "Neonatal Pharmacology." *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 15.3 (2014): 96-102.

Smith DE, Lin ET and LZ Benet. Absorption and disposition of furosemide in healthy volunteers, measured with a metabolite-specific assay. *Drug Metabolism and Disposition*. 8.5 (1980): 337-342.

Sola A, and H Baquero. "Oral Sildenafil in Neonatal Medicine: tested in Adults Also Used in Neonates." *Anales De Pediatría: Publicación Oficial De La Asociación Española De Pediatría (a.e.p.)*. 66.2 (2007): 167-176.

Somogy, A, Becker M, and R Gugler. "Cimetidine Pharmacokinetics and Dosage Requirements in Children." *European Journal of Pediatrics*. 144.1 (1985): 72-6.

Standing JF, and C Tuleu. "Paediatric Formulations-getting to the Heart of the Problem." *International Journal of Pharmaceutics*. 300 (2005): 56-66.

Stayer SA, and Y Liu. "Pulmonary Hypertension of the Newborn." *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 24.3 (2010): 375-386.

Steinhorn RH, Kinsella JP, Pierce C, Butrous G, Dilleen M, Oakes M, and DL Wessel. "Intravenous Sildenafil in the Treatment of Neonates with Persistent Pulmonary Hypertension." *The Journal of Pediatrics*. 155.6 (2009): 841-47.

Steinhorn RH, Kinsella JP, Pierce C, Butrous G, Maria Dilleen, Oakes M, and LD Wessel. "Intravenous Sildenafil in the Treatment of Neonates with Persistent Pulmonary Hypertension." *The Journal of Pediatrics*. 155.6 (2009): 841.

Steinlein OK, Conrad C, and B Weidner. "Benign Familial Neonatal Convulsions: Always Benign?" *Epilepsy Research*. 73.3 (2007): 245-249.

Storme L, Aubry E, Rakza T, Houeijeh A, Debarge V, Tourneux P, Deruelle P, and T Pennaforte. French Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. "Pathophysiology of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn: Impact of the Perinatal Environment." *Archives of Cardiovascular Diseases*. 106.3 (2013): 169-177.

Stoyanova-Beninska VV, Wohlfarth T, Isaac M, Kalverdijk LJ, van den BH, and CG Wied. "The Eu Paediatric Regulation: Effects on Paediatric Psychopharmacology in Europe." *European Neuropsychopharmacology: the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 21.8 (2011): 565-70.

Stroli-Benedetti M, Whomsley R, and EL Baltes. "Differences in Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Xenobiotics between the Paediatric and Adult Populations." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 1.3 (2005): 447-71.

Stroli-Benedetti M, and EL Baltes. "Drug Metabolism and Disposition in Children." *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 17.3 (2003): 281-299.

Stroli-Benedetti M, Whomsley R, and M Canning. "Drug Metabolism in the Paediatric Population and in the Elderly." *Drug Discovery Today*. 12 (2007): 15-16.

Subhedar NV, Jauhari P, and R Natarajan. "Cost of Inhaled Nitric Oxide Therapy in Neonates." *Lancet*. 359.9319 (2002): 1781-2.

Thomson SA, Tuleu C, Wong ICK, Keady S, Pitt KG, and AG Sutcliffe. Minitablets: New Modality to Deliver Medicines to Preschool-Aged Children. *Pediatrics* 123.2 (2009): 235-238.

Toral I, Pope S, Quintanilla S and P Richter. "Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry." *International Journal of Pharmaceutics*. 249 (2002): 1-2.

Towbin JA, Lowe AM, Colan SD, Sleeper LA, Orav EJ, Clunie S, Messere J, Cox GF, Lurie PR, Hsu D, Canter C, Wilkinson JD, and SE Lipshultz. "Incidence, Causes, and Outcomes of Dilated Cardiomyopathy in Children." *Jama: the Journal of the American Medical Association*. 296.15 (2006): 1867-76.

Travis LB. "The Kidney and Urinary Tract Morphogenic Development and Anatomy." *Rudolph's Pediatrics*, 19th Ed. 25 (1991): 1223-1236.

Treluyer JM, Gueret G, Cheron G, Sonnier M, and T Cresteil. "Developmental Expression of Cyp2c and Cyp2c-Dependent Activities in the Human Liver: In-Vivo/in-Vitro Correlation and Inducibility." *Pharmacogenetics*. 7.6 (1997): 441-52.

Trommer H and RH Neubert. "The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system". *International Journal of Pharmaceutics*. 298.1.(2005): 153-63.

USP35–NF30. The United States pharmacopoeia convention. Rockville, EEUU. Accessed 30 December 2012.

Viriyaroj A, Klapachan S, Phanpleewan C, Viriyaroj V, Sornchainthawatwong C and C Wiranidchaphong. Physicochemical and Microbiological stability of Phenytoin Sodium Extemporaneous Suspension. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 4.4 (2009): 463-470.

Walker RD and GR Cumming. "Response of the infant kidney to diuretic drugs." *Canadian Medical Association Journal*. 91.22 (1964): 1149-1153.

Walthall K, Cappon GD, Hurtt ME, and T Zoetis. "Postnatal Development of the Gastrointestinal System: a Species Comparison." *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 74.2 (2005): 132-156.

Wouldes TA, and LJ Woodward. "Maternal Methadone Dose During Pregnancy and Infant Clinical Outcome." *Neurotoxicology and Teratology*. 39 (2013): 119-121.

Yao, 2013. <http://blogs.fda.gov/fdavoices/index.php/tag/best-pharmaceuticals-for-children-act-bpca/> (Accedido Junio 2014)

Yılmaz U, Yılmaz TS, Dizdärer G, Akıncı G, Güzel O, and H Tekgül. "Efficacy and Tolerability of the First Antiepileptic Drug in Children with Newly Diagnosed Idiopathic Epilepsy." *Seizure: the Journal of the British Epilepsy Association*. 23.4 (2014): 252-9.

Zarowitz BJ, Robert S, and EL Peterson. "Prediction of Glomerular Filtration Rate Using Aminoglycoside Clearance in Critically Ill Medical Patients." *The Annals of Pharmacotherapy*. 26.10 (1992): 1205-10.

Zoetis T, Tassinari MS, Bagi C, Walthall K, and ME Hurtt. "Species Comparison of Postnatal Bone Growth and Development." *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 68.2 (2003): 86-110.

**ANEXO.**

**OTROS MÉRITOS**

---





## 1. PREMIOS

- N. Provenza, A.C. Calpena, B. Clares. III edición del premio Acofarma a la Innovación en Formulación Magistral. **Primer premio.** Estudio de fórmulas magistrales líquidas orales para uso pediátrico (Marzo 2012; Barcelona).

El texto fue publicado en cinco partes en la revista ACOFAR como sigue:

- Provenza Bernal N, Calpena Campmany AC, Clares Naveros B. Estudio de Fórmulas Magistrales Líquidas Orales para Uso Pediátrico (I). ACOFAR 2012, 519, 52-55.
  - Provenza Bernal N, Calpena Campmany AC, Clares Naveros B. Estudio de Fórmulas Magistrales Líquidas Orales para Uso Pediátrico (II). ACOFAR 2012, 520, 52-55.
  - Provenza Bernal N, Calpena Campmany AC, Clares Naveros B. Estudio de Fórmulas Magistrales Líquidas Orales para Uso Pediátrico (III). ACOFAR 2013, 520, 56-59.
  - Provenza Bernal N, Calpena Campmany AC, Clares Naveros B. Estudio de Fórmulas Magistrales Líquidas Orales para Uso Pediátrico (IV). ACOFAR 2013, 522, 62-63.
  - Provenza Bernal N, Calpena Campmany AC, Clares Naveros B. Estudio de Fórmulas Magistrales Líquidas Orales para Uso Pediátrico (V). ACOFAR 2013, 523, 51-53.
- N. Provenza. V Jornada de Recerca a la Facultat de Farmàcia. **Tercer premio.** Lagunas en los medicamentos para poblaciones especiales (Marzo 2012, Barcelona).

## 2. COMUNICACIONES EN FORMA DE PÓSTER Y COMUNICACIONES ORALES

- N. Provenza, B. Clares, L. Halbaut, Mallandrich, A. Sanchez, A.C. Calpena. Sildenafil oral liquid formulation for pediatrics. 9th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Marzo 2014, Lisboa). Póster.

- N. Provenza, B. Clares, Mallandrich, A. Sanchez, A.C. Calpena. Estudio de estabilidad de una formulación líquida oral de sildenafil para uso pediátrico. Infarma. Congreso Europeo de farmacia, medicamentos y parafarmacia (Marzo 2014, Madrid). Póster.
- N. Provenza, M. Mallandrich, B. Clares, R. Sanz, AC. Calpena. Study of commercially available excipients and their influence on the stability of pharmaceutical compounding for paediatric use. 5 th European Paediatric Formulation Initiative Conference (Septiembre 2013; Barcelona). Póster.
- M. Mallandrich, N. Provenza, B. Clares, L. Halbaut, F. Fernández, A. Flo, AC. Calpena. Estudio de estabilidad de fórmulas líquidas orales de metadona. XI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (Febrero 2013, Alicante). Póster.
- N. Provenza, A.C. Calpena, M. Mallandrich, M. Fernández, A. Ruiz, B. Clares, B. Pueyo. Oral liquid Formulations of Methadone. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (Marzo 2012; Estambul). Póster.
- N. Provenza, L. Halbaut, M. Mallandrich, A. Ruiz, A. Flo, C. Bau, B. Clares, A. C. Calpena. Estudio de estabilidad de dos soluciones orales de furosemida. Infarma. Congreso Europeo de farmacia, medicamentos y parafarmacia (Marzo 2012; Madrid). Póster.
- N. Provenza, L. Halbaut, B. Clares, C. Gutierrez, A. C. Calpena. Dissolution profile of three oral formulations of spironolactone. III Congress of the Portuguese Society of Pharmaceutical Sciences/ IX Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery. (Octubre 2011, Oporto). Póster.
- Beatriz Clares Naveros, José Manuel Manzanares Olivares, María Jesús Lucero Muñoz, Concepción Álvarez del Vayo, Manuela Atienza Fernández, Ana Vila García, María Adolfina Ruiz Martínez, Nora Provenza Bernal, María Dolores

Ruiz López, Ana Cristina Calpena Campmany. Unificación de criterios para la elaboración de fórmulas magistrales pediátricas. 60 Congreso Asociación Española de Pediatría (Junio 2011; Valladolid). Comunicación Oral.

- N. Provenza, B. Clares, C. Gutierrez, L. Halbaut, M<sup>a</sup>A. Ruíz, A. C. Calpena. Caracterización de un jarabe de espirolactona al 0,5% para uso pediátrico. X Congreso de la SEFIG – Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (Febrero 2011; Madrid). Póster.
- B. Clares, N. Provenza, M<sup>a</sup> A. Ruíz , V. Gallardo, A. C. Calpena. Ranitidine, Spironolactone and Furosemide paediatric extemporaneous formulations: preparation and stability study from a Spanish unified perspective. 2nd EuPFI conference (Septiembre 2010; Berlin). Póster.



**ESTUDIO DE FÓRMULAS MAGISTRALES LÍQUIDAS ORALES PARA USO PEDIÁTRICO.** Primer premio de la III Edición del Premio Acofarma a la Innovación en Formulación Magistral.



# Formulación al día

## Estudio de fórmulas magistrales líquidas orales para uso pediátrico (I)

### Índice

1. Introducción
2. Objetivos y Plan de Trabajo
3. Material y métodos
  - 3.1. Materias primas (fórmulas)
  - 3.2. Estudio de estabilidad
  - 3.3. Estudio del Ph
  - 3.4. Estudio reológico
  - 3.5. Cálculo de la concentración de principio activo en la fórmula
  - 3.6. Caracterización óptica mediante Multiple Light Scattering
  - 3.7. Determinación del tamaño de partícula
  - 3.8. Ensayo de disolución
4. Resultados y Discusión
  - 4.1. Soluciones de Ranitidina y Furosemida
    - 4.1.1. Estudio del Ph
    - 4.1.2. Estudio reológico
    - 4.1.3. Concentración de principio activo
  - 4.2. Suspensiones de Espironolactona
    - 4.2.1. Estudio del pH
    - 4.2.2. Estudio reológico
    - 4.2.3. Concentración de principio activo
    - 4.2.4. Estabilidad óptica mediante Multiple Light Scattering
    - 4.2.5. Tamaño de partícula
    - 4.2.6. Ensayo de disolución
5. Conclusiones
6. Agradecimientos
7. Bibliografía

### 1. Introducción

El uso clínico ideal de un fármaco debe basarse en los datos de eficacia y seguridad de cada agente en particular, siendo necesario precisar sus posibilidades de uso en función de cada indicación. Por otra parte, hay que tener en cuenta sus características cinéticas, para poder definir unas pautas de utilización y posología en cada uso concreto. Por último, pero no menos importante, se deben considerar otros factores como la facilidad de manejo (vía de administración) y coste.

- La prescripción de los fármacos se debe basar en el conocimiento de sus características *farmacocinéticas* y *farmacodinámicas* [1]:

- La *farmacocinética* es la rama de la farmacología que estudia el paso de las drogas a través del organismo, es decir, los procesos de absorción, distribución, transporte, metabolismo y excreción de los fármacos.

La farmacodinámica estudia los efectos farmacológicos de las drogas y el mecanismo de acción de las mismas a nivel molecular.

Desde el nacimiento hasta la edad adulta se producen una serie de modificaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas, que afectan a los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las drogas o fármacos y a sus mecanismos de acción, así como a la síntesis enzimática y la producción y distribución de

los receptores [2-4]. Estas modificaciones son máximas en la época perinatal con grandes cambios y necesidades adaptativas que condicionan las respuestas farmacocinéticas y de los receptores, cuyo desconocimiento ha llevado a numerosos fracasos terapéuticos. La consideración del niño, en especial del recién nacido, como si fuera un adulto pequeño, ha producido casos de severa iatrogenia medicamentosa como por ejemplo, kernicterus (por sulfas), síndrome gris del recién nacido (cloramfenicol) o sordezas (por aminoglucósidos).

Medicamentos que no están adaptados al metabolismo de los niños causan al año más de seis millones de muertes infantiles en todo el mundo. Así lo indica el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), llamado "Medicamentos a la medida de los niños" y que alerta de la necesidad de garantizar a los niños un mayor acceso a fármacos que traten de manera eficaz sus problemas de salud.

En la actualidad, a más de la mitad de los niños se les prescriben medicamentos cuya posología y forma farmacéutica está prevista para un adulto y que no están autorizados para los menores, ante la falta de una forma de dosificación para ellos [5].

Por tanto, una Terapéutica Farmacológica efectiva, segura y racional en neonatos, infantes y niños requiere del conocimiento de las diferencias en el mecanismo de acción, absorción, me-



tabolismo y excreción que aparecen durante el crecimiento y desarrollo, debido a que virtualmente, todos los parámetros farmacocinéticos se modifican con la edad, siendo esta el mayor determinante a la hora de dosificar, pero no se debe olvidar tampoco el estado de enfermedad, el sexo y las necesidades individuales. La falta de estos ajustes puede llevar a un tratamiento inefectivo o a la toxicidad.

Por todo ello, es necesario el uso de formas farmacéuticas adecuadas que garanticen la correcta administración, dosificación y cumplimiento terapéu-



tico. En nuestro país son numerosas las especialidades farmacéuticas que sólo están presentes en el mercado en forma de cápsulas o comprimidos y a dosis mucho más elevadas que las necesarias para lactantes y/o niños (ej: Furosemida, Espironolactona o Propranolol).

A nivel europeo, el pasado 26 de enero de 2007 entró en vigor un nuevo Reglamento Pediátrico en la Unión Europea (Reglamento 1901/2006, actualizado por el 1902/2006), cuyo objetivo es mejorar la salud de los niños en Europa mediante [6,7]:

- Facilitar el desarrollo y la disponibilidad de medicamentos para los niños de 0 a 17 años,
- Asegurar que los medicamentos para uso en niños son objeto de investigaciones éticas, de alta calidad y específicamente autorizados para su administración a la población pediátrica,
- Mejorar la disponibilidad de informa-

ción sobre el uso de medicamentos para los niños.

Todo ello sin someter a la población pediátrica a estudios innecesarios, o retrasar la autorización de medicamentos para uso en adultos.

El Reglamento Pediátrico cambia radicalmente el entorno regulatorio de los medicamentos pediátricos en Europa y es de aplicación tanto para los medicamentos nuevos como para los ya autorizados que posean alguna indicación para este grupo de edad.

Este Reglamento establece la obligación de presentar un Plan de Investiga-

ción Pediátrica (PIP), el cual es un plan de desarrollo destinado a garantizar que los datos necesarios se obtienen a través de estudios en niños, cuando es seguro hacerlo, para apoyar la autorización de los medicamentos específicos para niños. El plan debe ser presentado por las compañías farmacéuticas al Comité Pediátrico de la EMA (European Medicines Agency), el cual se encarga de aceptar o rechazar el plan.

Asimismo deberá cubrir las necesidades de todos los grupos de edad de los niños, desde el nacimiento hasta la adolescencia.

Pero no siempre es rentable económicamente para la industria, la fabricación de formas farmacéuticas para uso pediátrico puesto que, afortunadamente, no es un porcentaje muy alto de esta población el que necesita de su uso.

Por un motivo u otro, la falta de disponibilidad en el mercado farmacéutico de productos adaptados a las necesida-

des de los niños, y en especial a las del neonato, es relevante, por lo que es necesaria la elaboración de fórmulas magistrales, generalmente formulaciones líquidas (soluciones o suspensiones) orales que se plantean como alternativa a las formas farmacéuticas sólidas comercializadas.

No obstante la variabilidad en el diseño de dichas fórmulas magistrales junto con el escaso conocimiento de la estabilidad [8], conlleva la posibilidad de errores de medicación.

Son pocos los estudios que han evaluado la utilización de fórmulas magistrales para el uso en pediatría. Es decir que, el mayor inconveniente para difundir estos fármacos es la falta de investigación no sólo a nivel clínico, por motivos obvios, sino a nivel tecnológico.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio de algunas de las fórmulas magistrales líquidas más utilizadas en el territorio español, para de esta forma proceder a su elaboración y estudio de estabilidad.

El conocimiento de la estabilidad de estas fórmulas contribuirá a proporcionar unas garantías de calidad y seguridad, tanto al médico (a la hora de prescribir) como al farmacéutico (a la hora de elaborar y dispensar).

## 2. Objetivos y plan de trabajo

A la vista de lo anterior, el objetivo más inmediato de este trabajo fue desarrollar una serie de medicamentos básicos para uso pediátrico, mediante la formulación magistral, que garanticen la correcta dosificación, administración y cumplimiento terapéutico.

En especial, se estudiaron formulaciones líquidas orales como alternativa a las formas sólidas orales presentes en el mercado, entre cuyas ventajas destacan:

- Versatilidad para el ajuste de dosis, frecuentemente modificada en estos pacientes en función del peso o de la respuesta clínica.
- Facilidad de administración.
- Fiabilidad de la dosificación.
- Posibilidad de administración por sonda nasogástrica.

Los principios activos seleccionados para el presente estudio fueron:

- Ranitidina, que se utiliza principalmente como protector gástrico gracias a su efecto antihistamínico, concretamente por su efecto antagonista de los receptores histamínicos (H-2) produciendo una inhibición de las secreciones gástricas basales [9];

- Furosemida, un diurético del asa de la familia de las sulfonamidas [9], y de la misma manera que el resto de los diuréticos del asa, actúa interfiriendo en el mecanismo de intercambio de iones de sodio, potasio y cloro en el túbulo ascendente del asa de Henle. También posee capacidad inhibitoria de la actividad de la anhidrasa carbónica;

- Espironolactona: La espironolactona es un principio activo utilizado como diurético debido a sus propiedades antagonistas de la aldosterona [10]. Es de origen sintético, derivada de la 17-lactona, la cual es antagonista competitivo a nivel renal de la aldosterona y un diurético ahorrador de potasio, indicado en terapia para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, ascitis en pacientes con una enfermedad hepática, hipertensión arterial con renina baja, hipopotasemia y el síndrome de Conn.

Dicha elección se llevó a cabo en función de la importancia de estas sustancias en la prescripción pediátrica.

Al objeto de profundizar en las fórmulas de las sustancias activas seleccionadas los métodos y plan de trabajo fueron:

Recopilación de información sobre los *modus operandi* y formulaciones utilizadas en los principios activos que se estudiaron.

Puesta a punto de la técnica de elaboración de las fórmulas magistrales objeto de estudio.

Desarrollo y validación de un método sensible y rápido como técnica analítica de referencia para el análisis de Ranitidina, Espironolactona y Furosemida. Se evaluó la linealidad, la precisión y la exactitud del método analítico. Asimismo se determinaron los límites de cuantificación y detección para cada uno de los principios activos objeto de estudio.

Las soluciones o suspensiones elabo-

radas deberían ser capaces de mantenerse estables. No obstante, factores químicos, físicos y microbiológicos podrían conducir a una degradación prematura del principio activo.

Por todo ello, se estudió el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las diferentes formulaciones elaboradas protegidas de la luz.

### 3. Material y métodos

Principio activo	Excipientes
Ranitidina 15mg/ml *15mg/ml de la base equivalen a 16.8mg/ml de la sal	Jarabe simple 50 ml Agua purificada c.s.p 100 ml
<sup>1</sup> Furosemida 2mg/ml	<sup>2</sup> Nipagin Sódico® 0.68 mg <sup>3</sup> Nipasol Sódico® 0.34 mg <sup>4</sup> Sodio Fosfato 12 Hidratos 68.4 mg <sup>5</sup> Acido cítrico monohidratado 0.58 mg <sup>6</sup> Jarabe simple 0.4 ml <sup>7</sup> Agua purificada 0,56 ml
Espironolactona 5mg/ml	Jarabe simple c.s.p. 100 ml
Espironolactona 5mg/ml	Glicerina 10% Jarabe simple c.s.p. 100 ml
Espironolactona 5mg/ml	Glicerina 10% Carboximetilcelulosa sódica 0,2% Jarabe simple c.s.p. 100 ml

#### 3.1. Materias primas (Fórmulas)

##### Método de preparación:

###### • Solución de Ranitidina:

Pesar la Ranitidina y disolverla en casi todo el volumen de agua. Una vez disuelta, añadir el jarabe simple y enrasar con agua purificada.

###### • Solución de Furosemida:

Pesar y disolver 2, 3, 4, lentamente y en el orden indicado en aproximadamente la mitad del volumen de agua. (No añadir el siguiente componente hasta que el anterior se haya disuelto completamente). Por otro lado, pesar y disolver 5 en un poco de agua. Una vez disuelto, añadir sobre la solución anterior. Adicionar la Furosemida lentamente. Finalmente añadir 6 y enrasar con 7. Filtrar.

###### • Suspensiones de Espironolactona

1. Primero de todo, realizar la pesada de la espironolactona. A continuación, se incorpora lentamente el jarabe simple con la ayuda de un agitador mecánico.

2. Primero, se pesa la espironolactona. En segundo lugar, se añade la glicerina con el objetivo de humectarla. Finalmente, se añade el jarabe simple en continua agitación.

3. Una vez pesada la espironolactona, se añade la glicerina con el objetivo de aumentar la humectación. A continuación, se añade el jarabe simple y para finalizar, se añade muy lentamente la

carboximetilcelulosa. El proceso se realiza en continua agitación.

De cada fórmula se preparó también la fórmula sin principio activo con el objeto de conocer la evolución que siguen los excipientes por separado. •

##### Equipo investigador:

###### Doctorando:

**Nora Provenza Bernal**

**Dra. Ana C. Calpena Campmany**

**Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética.**

**Departamento de Farmacia y**

**Tecnología Farmacéutica.**

**Facultad de Farmacia.**

**Universidad de Barcelona**

**Dra. Beatriz Clares Naveros**

**Departamento de Farmacia y**

**Tecnología Farmacéutica**

**Facultad de Farmacia.**

**Universidad de Granada**



Primer premio de la III Edición del Premio Acofarma a la Innovación Magistral

# Formulación al día

## Estudio de fórmulas magistrales líquidas orales para uso pediátrico (II)

### 3.2. Estudio de estabilidad

Teniendo en cuenta las especiales características de estos medicamentos individualizados, cuando es aplicable, se sigue la "European guideline on stability of existing active substances and related finished products" [11].

Para la determinación de la estabilidad, se separaron alícuotas de cada formulación en viales de 10 ml de vidrio topacio y se almacenaron a tres temperaturas diferentes (4 °C, 25 °C y 40°C). Se controlaron aquellos parámetros cuantificables susceptibles de cambiar a lo largo del tiempo [12] como las características organolépticas, el pH, la reología o la concentración de la sustancia activa. Una elevada modificación de estos parámetros podría ser indicativa de fenó-



menos de inestabilidad.

En el caso de las suspensiones de espironolactona, esta fase de la investigación se completó además con la determinación de la estabilidad óptica mediante multiple light scattering, se determinó además el tamaño de partícula y se llevó a cabo un ensayo de disolución comparativo con un comprimido comercializado tomado como referencia.

El periodo de estudio fue de 2 meses tomando muestras periódicas para su evaluación a los 0, 7, 15, 30 y 60 días desde el momento de su elaboración.

El número de determinaciones efectuadas por fórmula, tiempo y temperatura fue como mínimo de 3. Se calcularon las medianas, medias y desviaciones estándar para cada uno de los ensayos y todos los resultados se sometieron a un tratamiento estadístico de ANOVA para un nivel de confianza del 95%, con objeto de comprobar si existían diferencias significativas entre las medidas comparadas.

### 3.3. Estudio del pH

La determinación del pH de las formulaciones preparadas se realizó con un pH-metre Crison microPH 200, Model 2000.

El pH de los tres jarabes se determinó a los 0, 7, 15, 30 y 60 días; y a las distintas temperaturas de almacenamiento (4°C, 25°C y 40°C).

Una variación significativa del pH sobre un valor adecuado para cada formulación podría indicar una degradación del

preparado [13] o bien una errónea elaboración.

### 3.4. Estudio reológico

La determinación de los valores de viscosidad así como del comportamiento reológico, se llevó a cabo a los 0 y 30 días de estudio a la temperatura de 25°C. Para ello se utilizó un reómetro HAAKE (RS1), acoplado a los siguientes elementos:

- Rotor placa-placa (P60Ti).
- Termostato.
- Filtro de aire.
- Ordenador con los programas HAAKE Rheowin Job Manager v. 3.3 para realizar las medidas a partir de las muestras de jarabe y HAAKE Rheowin Data Manager v 3.3 para realizar el tratamiento de los datos obtenidos.

A continuación se detallan las condiciones del equipo para poder realizar el estudio de las muestras:

- Sensor: PP60 Ti.
- Factor-A: 23580.000 Pa/Nm.
- Factor-M: 149.850 (1/s)/(rad/s).
- Inercia: 1.234e-05 kg m<sup>2</sup>.
- Amortiguación: 30.00.
- Coeficient de dilatació tèmica: 1.100 µm/°C.
- Compliance: 0.003157 rad/Nm.
- Ranura: 0.200 mm.

### 3.5. Cuantificación de la sustancia activa

La concentración de la sustancia activa en cada una de las formulaciones se lleva a cabo a los 0, 7, 15, 30 y 60 días a las diferentes temperaturas de estudio (4, 25 y 40 °C).

### 3.5.1. Método analítico

Como técnica cuantitativa en el caso de Ranitidina y Furosemida se utilizó el método espectrofotométrico. La valoración se realizó en un espectrofotómetro Amersham Biosciences Modelo Ultrospec 1100, acoplado a un ordenador provisto del programa UV-Vis 8500, a las longitudes de onda de 314.6 nm y 271.5 nm para ranitidina, y furosemida, respectivamente [14-16].

En el caso de la espironolactona, debido a sus propiedades intrínsecas así como por la propia experiencia, se utilizó como técnica analítica la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Waters 717 plus autosampler, acoplado a un ordenador provisto del programa Millennium32, una columna atlantis® dC18 5µm 4.6x150 mm y un flujo de 0.8 ml/min; a una longitud de onda de 242 nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla metanol:agua (63:37) [16].

La cantidad de principio activo presente en cada fórmula se obtuvo a partir del análisis de las muestras diluidas a los diferentes tiempos, a partir de una recta patrón.

El preparado se considera estable si la concentración de principio activo se halla en el rango ± 10% de la concentración nominal.

### 3.2.2. Validación de la técnica analítica para la cuantificación del principio activo [17, 18].

La validación de las metodías analíticas se llevó a cabo mediante la preparación y valoración de 6 rectas de calibración, elaboradas en días diferentes (valoración inter día).

Los solventes empleados para tal fin fueron agua, Metanol:agua (30:70) y NaOH 0.1 M, para ranitidina, espironolactona y furosemida, respectivamente. Como criterios fundamentales de validación de la metodología analítica empleada se utilizaron la linealidad, la precisión y la exactitud.

#### • Linealidad

Representa la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones del producto utilizado, para las cuales

el método es satisfactorio. Una de las metodologías para estudiar la linealidad de las respuestas es comparar los valores medios de las relaciones entre la respuesta y su concentración.

Si  $p > 0,05$  significa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios medidos y los valores teóricos y, por tanto, la técnica utilizada es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.

#### • Precisión

Es el grado de dispersión entre los valores obtenidos al determinar un analito en un ensayo de realizando varios replicados. Se expresa como desviación estándar (DE) o desviación estándar relativa (CV). Es uno de los criterios más importantes, junto a la exactitud, para determinar la validez de un método analítico.

Una de las medidas de precisión es el coeficiente de variación porcentual que se estima a la variabilidad de los valores predecibles:

Cexp es el valor interpolado medio encontrado en los diferentes replicados de cada nivel de concentración.

DE es la desviación estándar de los valores interpolados de cada concentración.

Un método se considera preciso si los valores de CV (%) se encuentran por debajo del 10%.

$$CV (\%) = (DE/Cexp) * 100$$

#### • Exactitud

La exactitud representa el grado de concordancia entre el valor medio y el valor considerado como verdadero. Indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más parecidos posibles al valor verdadero. Las diferencias entre los valores predecidos (Cexp) y los valores teóricos o de referencia (Cteor) constituyen una estimación absoluta de la cuantificación en cada concentración y se expresa como valor relativo, es el

error relativo en porcentaje.

Cexp es la concentración interpolada media encontrada para cada nivel de concentración.

Cteor es la concentración en cada punto de la recta estudiada, son valores que corresponden a la concentración elaborada en las rectas patrón.

Se expresa concretando el valor más alto y el más bajo encontrado entre las concentraciones de fármaco encontradas en la validación del método analítico.

Un método se considera exacto si el del EE (%) es inferior al 10%.

$$EE (\%) = ((Cexp - Cteor) / Cteor) * 100$$

#### • Límite de cuantificación

Es la cantidad mínima de fármaco que puede ser cuantificada mediante el proceso analítico con una precisión y exactitud aceptables. Es el punto más bajo de la recta de calibrado. El límite de cuantificación caracteriza la habilidad de un proceso analítico para cuantificar un analito.

$$LQ (\mu g/mL) = 10.S / p$$

S es la desviación estándar de la ordenada en el origen.  
P es la pendiente de la recta.

#### • Límite de detección

Es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada a través el método analítico.

El límite de detección se calcula con la siguiente fórmula:

$$LD (\mu g/mL) = 3,3.S / p$$

Como soporte informático para el tratamiento de los datos se utiliza el programa: Graph Pad Prism.

### 3.6. Estabilidad óptica mediante multiple light scattering

Mediante esta técnica se detectan los cambios en el tamaño o localización de



las partículas en el seno de las muestras mediante dos detectores, uno para la transmisión y otro para el backscattering o retrodispersión.

El dispositivo utilizado fue el Turbiscan™ Lab.

Los ensayos se realizaron a 25 °C y la toma de muestra comprendió 0 y 30 días.

### 3.7. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula de las suspensiones de espirolactona fue llevado a cabo mediante difracción laser (LD, Mastersizer 2000E, Malvern, UK).

Las suspensiones fueron diluidas con agua purificada. El tamaño de partícula se evaluó mediante la distribución porcentual del número de partículas de un determinado tamaño (10, 50 y 90%). Con el fin de evaluar la estabilidad de las suspensiones preparadas, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (25 °C), y las mediciones se realizaron a los días 0 y 60.

### 3.8. Ensayo de disolución

El estudio de disolución se realizó según las condiciones que indica la USP <711> [16]. Se comparó el perfil de disolución de los tres jarabes con el de los comprimidos que están comercializados (Aldactone®), ajustando la dosis de los jarabes a la de los comprimidos.

Se utilizó el aparato de palas a 75 rpm y la duración del estudio fue de 60 minutos. El medio de disolución fue ácido clorhídrico 0,1N con 0,1% de lauril sulfato sódico y la temperatura del ensayo fue de 37°C.

El muestreo en los comprimidos fue a los 2, 5, 8, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60, minutos, mientras que el de los jarabes fue a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 60 minutos

La cuantificación del principio activo en cada muestra se obtuvo mediante espectrofotometría UV a la longitud de onda de 242 nm. Este método se validó previamente teniendo en cuenta

los parámetros de linealidad, precisión y exactitud [17, 18]. El equipo que se utilizó para ello fue el espectrofotómetro UV Amersham Biosciences Modelo Ultrospec 1100 pro, acoplado a un ordenador provisto del programa UV-VIS 8500.

El método de ajustado se llevó a cabo mediante el programa informático GraphPad Prism3. Se probaron diferentes modelos, algunos de los cuales los vemos en la tabla 2. •

**Nora Provenza Bernal**  
**Dra. Ana C. Calpena**  
**Campmany**  
**Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética.**  
**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.**  
**Facultad de Farmacia.**  
**Universidad de Barcelona**

**Dra. Beatriz Clares Naveros**  
**Dra. Adolfin Ruiz Martínez**  
**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**  
**Facultad de Farmacia.**  
**Universidad de Granada**

#### Agradecimientos:

- Instituto Tecnológico del Medicamento Individualizado (ITMI)
- Comisión Permanente del Symposium Rafael Alvarez Colunga de Unificación de Criterios en Formulación Magistral Pediátrica.

Associació primera fase exponencial	$Y = Y_{max} \cdot (1 - e^{-k \cdot X})$
Associació segona fase exponencial	$Y = Y_{max_1} \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot X}) + Y_{max_2} \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot X})$
Boltzman sigmoid	$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + \exp\left(\frac{V50 - X}{Slope}\right)}$

Tabla 2: Ejemplos de modelo de ajustado



Primer premio de la III Edición del Premio Acofarma a la Innovación Magistral

# Formulación al día

## Estudio de fórmulas magistrales líquidas orales para uso pediátrico (III)



### 4. Resultados y discusión

#### 4.1. Soluciones de ranitidina y furosemida:

##### 4.1.1. Resultados de pH

cuación, para la administración en humanos, los comprendidos entre 6.5-7.5 [19-22].

Para la solución de Furosemida, los va-

Fármaco	Temperatura	0	7	15	30	60
Ranitidina	4	-	5,81	5,76	6	6,10
	25	4,99	6,9	5,88	6,29	6,48
	40	-	5,77	5,80	6,4	6,09

Tabla 3. Valores de pH (mediana) para la solución de Ranitidina a los diferentes tiempos y temperatura

En el caso de la solución de Ranitidina, los resultados obtenidos muestran un pH ligeramente ácido al inicio del ensayo alcanzando valores próximos a 6 transcurridos 30 días de estudio; precisamente referencias anteriores, como patentes, aluden a estos mismos rangos de valores, resaltando por su ade-

lores de pH se mantienen cerca de 7.5 a lo largo del tiempo, no observándose diferencias estadísticamente significativas a las diferentes temperaturas. Estudios anteriores [23-25] muestran que la furosemida es inestable en medios ácidos, y muy estable en medios básicos.

Fármaco	Temperatura	0	7	15	30	60
Furosemida	4		7,62	7,59	7,55	7,63
	25	7,62	7,54	7,62	7,56	7,62
	40		7,62	7,49	7,47	7,62

Tabla 4. Valores de pH (mediana) para la solución de Furosemida a los diferentes tiempos y temperaturas

#### 4.1.2. Estudio reológico

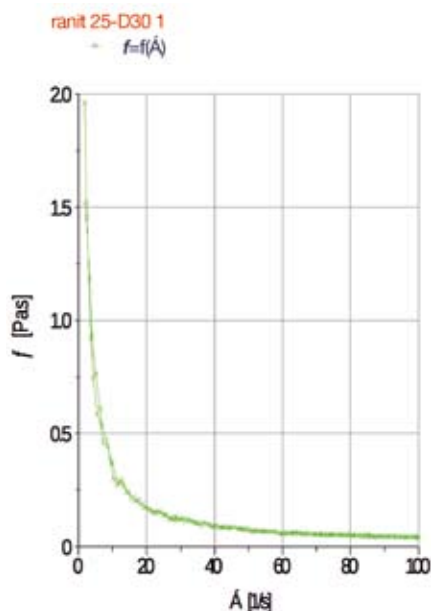


Figura 4. Perfil reológico de Ranitidina

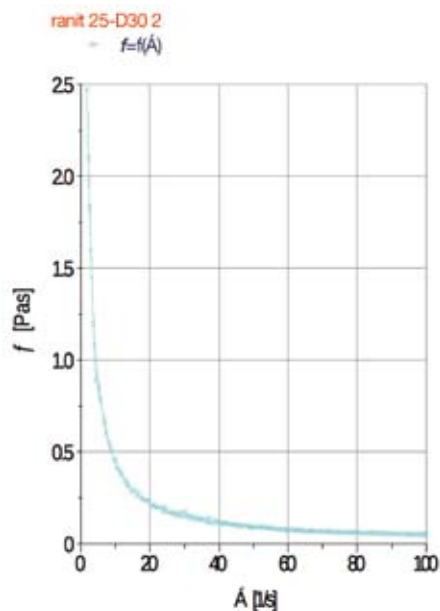


Figura 5. Perfil reológico de Furosemida



	0	30
Ranitidina	45.63±0.441	41.81±0.640

Tabla 5. Valores de viscosidad de Ranitidina

	0	30
Furosemida	36.76±5.09	47.30±4.898

Tabla 6. Valores (media y desviación estándar) de viscosidad de Furosemida

En ambos casos, tal y como muestran las tablas 5 y 6, el paso del tiempo ejerce pequeñas diferencias sobre los valores de viscosidad, aunque no relevantes en cuanto a la adecuación o facilidad de dosificación.

Respecto al comportamiento reológico, las figuras 4 y 5 muestran que ambas formulaciones presentan un flujo pseudoplástico no tixotrópico.

##### 4.1.1. Cuantificación de la sustancia activa

###### a) Validación de la metodología analítica.

En el caso de la ranitidina el método analítico resultó ser lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones 0.625-20 mg/ml.

	Ranitidina
Límite Detección	0.074±0.041
Límite Cuantificación	0.223±0.124

Tabla 7. Media (µg/ml) ± Desviación Estándar de los límites de detección y cuantificación de ranitidina.

El método para la furosemida fue validado entre las concentraciones de 25 µg/ml y 0,7812525 µg/ml.

	Furosemida
Límite Detección	0.198±0.085
Límite Cuantificación	0.6±0.26

Tabla 8. Media (µg/ml) ± Desviación Estándar de los límites de detección y cuantificación de furosemida

###### b) Evolución de la concentración de la sustancia activa:

La figura 5 refleja que la cantidad de principio activo en la fórmula a lo largo del tiempo se mantiene invariable tanto para Furosemida como para Ranitidina, independientemente de la temperatura de conservación, no observándose variaciones superiores al ± 10% en ningún ensayo. En ningún caso se observan variaciones estadísticamente significativas en función de la temperatura. Esto representará una ventaja en cuanto a la conservación, siendo en ambos casos la estabilidad, independiente de la temperatura.

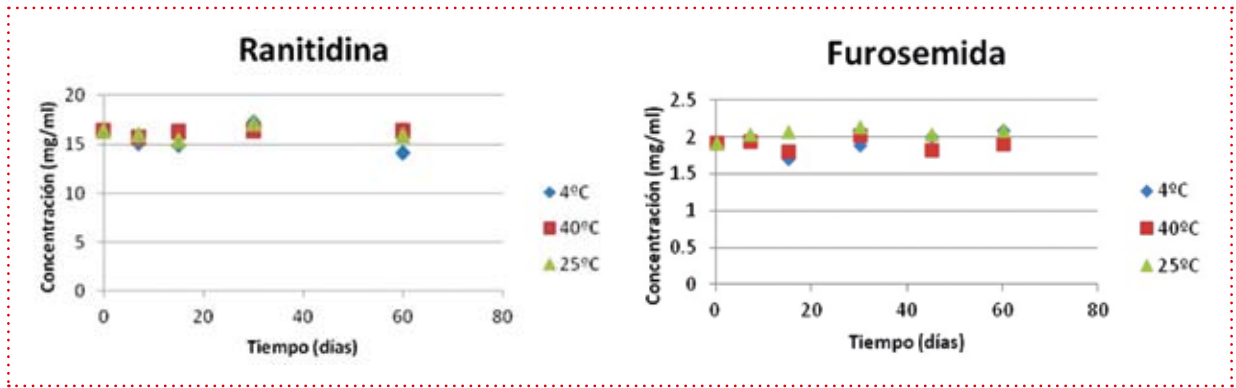


Figura 5. Concentración de Ranitidina y Furosemida en función del tiempo (4, 25 y 40°C)

## 4.2. Suspensiones de Espironolactona

### 4.2.1 Estudio del pH

bato potásico) en el jarabe simple [12]. En todos los casos, el valor de pH se mantuvo bastante constante en el tiempo alcanzando un valor máximo a día

Fármaco	Temperatura	0	7	15	30	60
Suspension 1	4	-	6.93	6.65	6.57	6.32
	25	5.42	7	6.56	6.20	6.78
	40	-	6.75	6.55	6.07	5.78
Suspension 1	4	-	6.92	6.91	6.69	6.09
	25	5.58	6.92	6.83	6.77	6.19
	40	-	6.71	6.68	6.46	5.41
Suspension 1	4	-	6.54	6.48	6.46	5.98
	25	5.61	6.60	6.51	6.50	6.02
	40	-	6.60	6.37	6.22	5.28

Tabla 9: pH (mediana) de las tres suspensiones de espironolactona a 4°C, 25°C y 40°C a los diferentes tiempos

Las consultas bibliográficas realizadas indican que el pH óptimo de la espironolactona es de 4,5 [26, 27]. En la tabla 9 se puede observar que los valores obtenidos fueron ligeramente superiores, rondando valores próximos a 6.5, lo cual podría ser consecuencia de la presencia de conservantes (sor-

7 y descendiendo ligeramente a partir de este momento. Aparentemente, al igual que en estudios reportados anteriormente, la diferencia de temperatura no influye en el pH [12]. Tal y como se observa más adelante, este pequeño aumento del pH no afecta a la cantidad de principio activo presente en las dife-

rentes fórmulas a lo largo del tiempo.

### 4.2.1. Estudio reológico

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones reológicas a día 0, sobre las muestras almacenadas a la temperatura de 25°C:

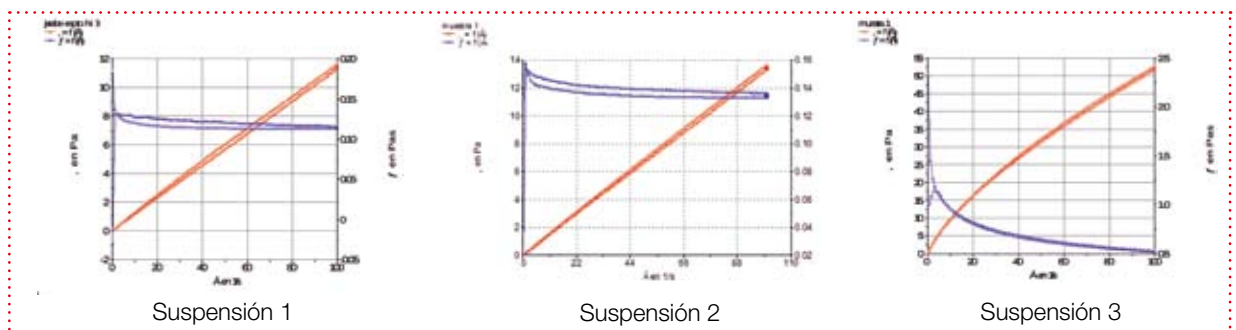


Figura 6: Curva de flujo (roja) y curva de viscosidad (azul) de las suspensiones 1, 2 y 3 de espironolactona a día 0 y 25°C.



La figura 6 muestra que el comportamiento de las suspensiones 1 y 2 sometidas a cizalla es de tipo newtoniano, lo que significa que existe una relación lineal entre la fuerza de cizalla y la tasa de deformación. La pendiente de la curva de flujo es constante y por tanto, la gráfica de la viscosidad es una recta indicativo de que la viscosidad se mantiene constante y es independiente de la velocidad de deformación [28, 29]. La diferencia que hay entre el tramo ascendente y descendente de estas curvas no es significativa.

Diferente es el caso de la suspensión 3 que resultó ser de tipo no newtoniano, pseudoplástico. Este hecho es debido a la presencia de carboximetilcelulosa [30]. La viscosidad de los fluidos no newtonianos cambia según la fuerza de cizalla y por tanto estos sistemas no tienen una viscosidad constante [29]. Se observa además que el fluido es no tixotrópico ya que los tramos ascendente y descendente de las curvas se superponen.

Las determinaciones reológicas a día 30 se muestran a continuación:

En el caso de la suspensión 1, la determinación realizada a día 30 no permitió la obtención de resultados coherentes dando una elevada variabilidad en las lecturas.

El comportamiento reológico de la suspensión 2 a día 30 continuó siendo de tipo newtoniano.

A día 30, la suspensión 3 se siguió mostrando como un fluido de tipo pseudoplástico y no tixotrópico.

En ambos casos, tanto a día 0 como a día 30, se determinó el valor de la viscosidad de las suspensiones a partir del tramo de cizalla constante de la curva de la viscosidad, a  $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$ .

Los resultados obtenidos tanto en la suspensión 2 como en la suspensión 3 indican que las formulaciones de espironolactona estudiadas fluidifican ligeramente en un tiempo relativamente corto. Esta pequeña disminución de los valores de la viscosidad no es relevante teniendo en cuenta el uso al que van destinadas. •

**Nora Provenza Bernal**

**Dra. Ana C. Calpena Campmany**  
Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Barcelona

**Dra. Beatriz Clares Naveros**  
**Dra. Adolfinia Ruiz Martínez**  
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Granada

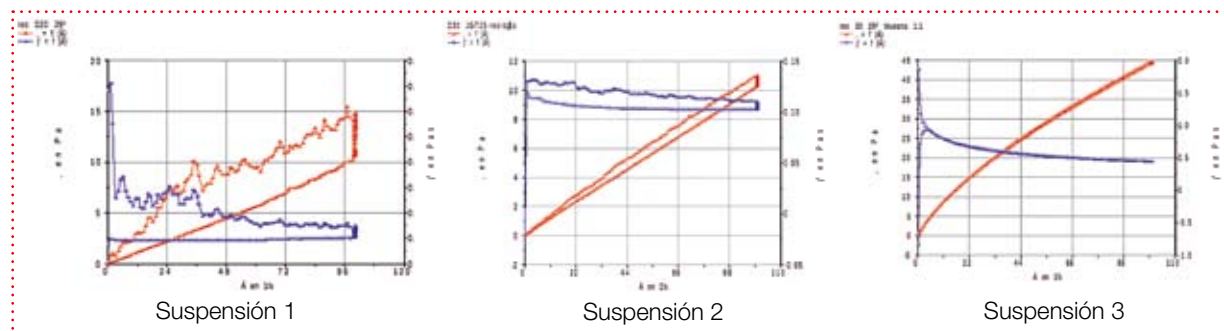


Figura 7: Curva de flujo (roja) y curva de viscosidad (azul) de las suspensiones 1, 2 y 3 de espironolactona a día 30 y 25°C

	Día 0	Día 30
Suspensión 1	114.5 mPa·s ± 0.87 mPa·s	-
Suspensión 2	134.7 mPa·s ± 0.87 mPa·s	105.9 mPa·s ± 2.17 mPa·s
Suspensión 3	522.1 mPa·s ± 2.71 mPa·s	445.0 mPa·s ± 1.99 mPa·s

Tabla 10. Valores de la media aritmética de los valores de viscosidad para las tres suspensiones de espironolactona (días 0 y 30; 25°C).

**Agradecimientos:**

- Instituto Tecnológico del Medicamento Individualizado (ITMI)
- Comisión Permanente del Symposium Rafael Alvarez Colunga de Unificación de Criterios en Formulación Magistral Pediátrica.

III Premio Acofarma a la  
Innovación en Formulación Magistral

## ESTUDIO DE FÓRMULAS MAGISTRALES LÍQUIDAS ORALES PARA USO PEDIÁTRICO (IV)

Equipo investigador:

Doctorando:  
Nora Provenza Bernal

Dra. Ana C. Calpena Campmany

Unidad de Biofarmacia  
y Farmacocinética. Departamento  
de Farmacia y Tecnología Farma-  
céutica. Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

Dra. Beatriz Clares Naveros  
Dra. Adolfina Ruiz Martínez

Departamento de Farmacia  
y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Granada

### 4.2.3. Estudio de la concentración de espiro- lactona en las suspensiones

El método elegido (HPLC) resultó ser lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones de 25 a 0,78 µg/ml. El límite de detección fue de 0,22± 0,26 µg/ml y el límite de cuantificación de 0,68± 0,79 µg/ml.

La concentración teórica de espirolactona en las suspensiones es de 5 mg/ml, por tanto, los valores que se consideran aceptables son aquellos que están dentro del intervalo ±10% (4,5 mg/ml-5,5 mg/ml). Las figuras 8, 9 y 10 muestran la concentración de espirolactona en las diferentes formulaciones, a los diferentes tiempos y temperaturas estudiadas.

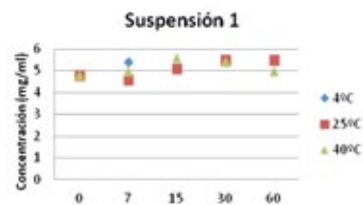


Figura 8. Evolución de la concentración de espirolactona en la suspensión 1.

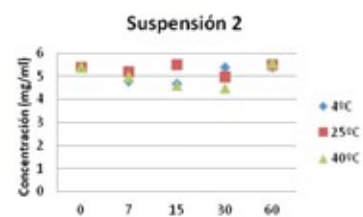


Figura 9. Evolución de la concentración de espirolactona en la suspensión 2.

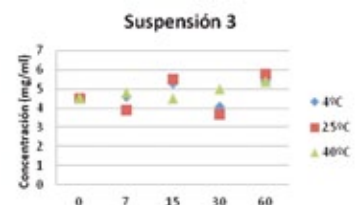


Figura 10. Evolución de la concentración de espirolactona en la suspensión 3.

En el caso de las suspensiones 1 y 2, todos los valores obtenidos se hallaron

dentro del intervalo definido ( $\pm 10\%$ ) y no se detectaron variaciones estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes tiempos de estudio a cada una de las temperaturas estudiadas al realizar el test de ANOVA. Por tanto en base a los resultados obtenidos y al análisis estadístico posterior, a ambas formulaciones se les otorgó una estabilidad de 60 días tanto a 4°C como a 25 y 40°C.

Tal y como se presenta en la figura 10, en el caso de la suspensión 3, se observó una mayor variabilidad en los resultados obtenidos a las temperaturas de 4 y 25°C, lo cual se atribuyó a la presencia de carboximetilcelulosa en la fórmula que le aporta una mayor viscosidad y por tanto, dificulta el muestreo. A 40°C la concentración de espirolactona se mantuvo dentro de los límites especificados a lo largo de todo el estudio. Este hecho se explica debido a que las elevadas temperaturas disminuyen la viscosidad de la fórmula facilitando por tanto la toma de muestra. En todos los casos, las gráficas obtenidas por cromatografía HPLC revelaron un pico equivalente a los standards, sin observar la presencia de otros picos diferentes a los debidos al principio ac-

tivo o a los excipientes, que pudieran hacer referencia a la aparición de otras moléculas como productos de degradación. Por todo ello, a la suspensión 3 también se le otorgó una estabilidad de 60 días a las tres temperaturas estudiadas.

#### 4.2.4. Estudio de la estabilidad óptica

Las muestras se sometieron al *turbiscan lab expert* a una temperatura de 25°C durante 24 horas. Al tratarse de

dispersiones opacas, cada hora se realizó la medida de los datos de backscattering (figura 12), ya que en estos casos la luz dispersada proporciona una elevada información. A día 0, en todos los casos se observó un incremento del backscattering en la parte superior de la muestra, que generó un incremento de la concentración en dicha zona (flotación) y un ligero decrecimiento en la parte inferior característico de un proceso de clarificación.

No se registraron cambios importantes entre el estudio realizado a día 0 y a día 30 para las suspensiones 1 y 2. Algo diferente ocurrió en el caso de la suspensión 3, donde a día 30 se observó una flotación predominante con una mayor concentración de partículas en todo el envase que a día 0. La presencia de la carboximetilcelulosa hace que las partículas permanezcan más tiempo en suspensión, y por tanto, enlentece los fenómenos de flotación. •

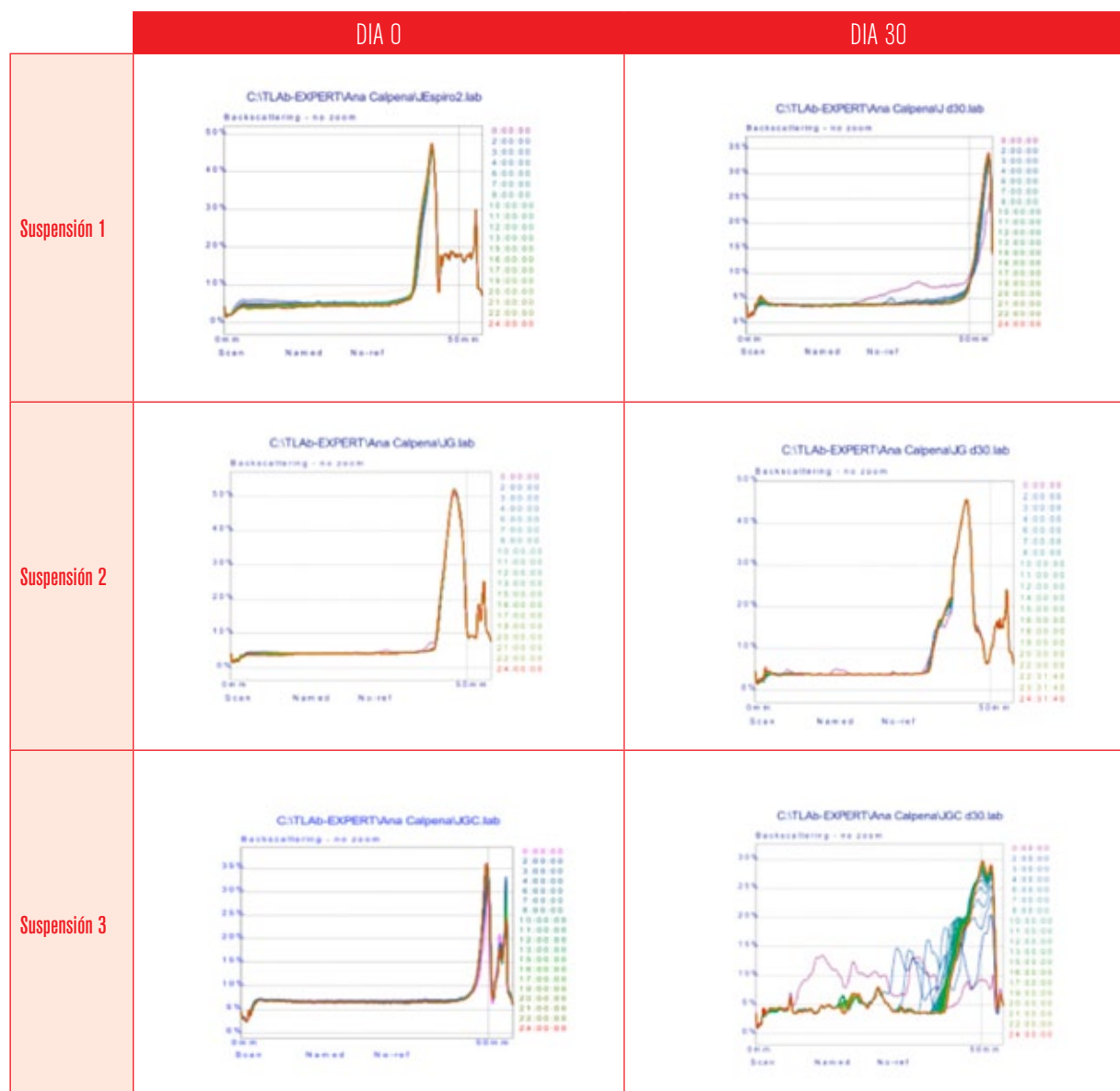


Figura 12. Gráficas de Backscattering para las suspensiones de espironolactona a días 0 y 30 (25°C).

Formulación al día

III Premio Acofarma a la Innovación en Formulación Magistral

ESTUDIO DE FÓRMULAS  
MAGISTRALES LÍQUIDAS ORALES  
PARA USO PEDIÁTRICO (y V)

Nora Provenza Bernal  
Dra. Ana C. Calpena Campmany

Dra. Beatriz Clares Naveros  
Dra. Adolfina Ruiz Martínez

Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

4.2.5. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula fue determinado a día 0, justo después de su preparación y al final del estudio.

rededor de 73 µm a lo largo del estudio, mientras que en los otros dos casos se observó un ligero aumento del tamaño de partícula a día 60 en relación a los

	Día 0			Día 60		
	(10%)	(50%)	(90%)	(10%)	(50%)	(90%)
Suspensión 1	16.2	35.4	73.7	12.6	28.4	73.1
Suspensión 1	6.6	14.1	27.9	8.2	16.3	30.4
Suspensión 1	5.5	12.7	26.9	9.1	17.8	33.1

Tabla 12. Tamaños medios de partícula de espirolactona (en µm) agrupados en tres porcentajes de distribución (10, 50 y 90%).

Los porcentajes indican el volumen de las partículas que tienen un diámetro igual o inferior a los valores mencionados.

Tal y como se observa en la tabla 12, se trata de dispersiones groseras (según la clasificación de Ostwald), ya que el tamaño de partícula está por encima de 0,1 µm. La suspensión 1 es la que manifiesta un tamaño mayor de partícula. Las partículas de espirolactona tienden a agregarse entre sí, pero la presencia de humectantes como la glicerina o la carboximetilcelulosa ayudan a mantener la espirolactona en suspensión en el momento de la preparación. En la suspensión 1, el 90% de las partículas mantuvieron un tamaño de al-

rededor de 73 µm a lo largo del estudio, siendo este hecho más acusado en el caso de la suspensión 3. Este fenómeno es debido a la agregación posterior de las partículas. Con el tiempo, las fuerzas de atracción vencen las fuerzas de repulsión, debidas a la acción dispersante de la carbocimetilcelulosa y/o la glicerina, favoreciendo por tanto la agregación de las partículas de espirolactona.

4.2.6. Ensayo de disolución

El método seleccionado para realizar el estudio analítico en el ensayo de disolución resultó ser lineal, exacto y preciso entre el rango de concentraciones de 0,78 a 25 µg/ml.

El límite de cuantificación fue de 3,92 ±0,65 µg/ml.

Las suspensiones 1 y 2 se disolvieron prácticamente de forma inmediata, no siendo así para la fórmula 3, la cual tardó alrededor de 10 minutos en alcanzar la concentración máxima de sustancia activa. Por este motivo, se realizó la comparación de los resultados obtenidos para la suspensión 3 y los comprimidos comercializados [31].

La tabla 13 muestra los parámetros amodelísticos. Como era de esperar, para los comprimidos la eficacia fue más baja y el tiempo de disolución fue más alto que para la suspensión 3.

AMODELISTIC PARAMETERS			
FORMULATIO N	MDT (min)	AUC (mg min)	EFFICAC Y (%)
TABLET	10.2	1317.8	82.9
SYRUP (FORMULA 3)	4.8	1403.0	91.8

Tabla 13: Parámetros amodelísticos

El coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) se utilizó como procedimiento discriminatorio para determinar el modelo que mejor explicaba los perfiles de disolución en ambas formas farmacéuticas. En el caso de la suspensión, el modelo

que más se ajustó a los datos obtenidos fue "Boltzmann sigmoid". En general este modelo es utilizado para simular el transporte y la reacción de fluidos en un medio poroso [32]. En este caso, probablemente el polímero (CMC) desarrolle una función similar a las matrices porosas y por tanto, presente el mismo modelo. Otros autores [33] usaron el modelo "Coupled multiphase lattice Boltzmann" para simular disoluciones de gotitas de líquidos inmiscibles en otros líquidos durante el proceso de subida resultante de la flotabilidad.

BEST FIT VALUES	GOODNESS OF FIT
Bottom 2.33 mg	Degrees of Freed 10
Top 25.61 mg	R <sup>2</sup> 0.9967
V50 5.16 min	Absolute sum of 2.481 squares
Slope 1.61 min	Sy.x 0.4981

Tabla 14. Sigmoidea de Boltzmann (suspensión).



Figure 10: Perfil de disolución para la suspensión.

Para los comprimidos, el modelo que mejor se ajustó a los datos obtenidos fue "la asociación exponencial en dos fases. Este modelo se utiliza cuando el resultado medido es la suma de un rápido y un lento decaimiento exponencial. En nuestro caso, esto podría ser debido a una rápida disolución de la cubierta pelicular de los comprimidos al principio, seguida de una lenta desintegración debida a excipientes presentes en los mismos (sulfato cálcico o almidón de maíz) que limitan el proceso de disolución.

Ambas formulaciones siguen diferentes cinéticas en sus perfiles de disolución. Entre los comprimidos y la suspensión, como era de esperar, la suspensión es la que tiene un menor tiempo medio de

BEST FIT VALUES	GOODNESS OF FIT
YMAX1 -5.20 mg	Degrees of Freed 7
K1 0.62 min <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup> 0.9991
YMAX2 31.18 mg	Absolut sum of squares 0.5188
K2 0.12 min <sup>-1</sup>	Sy.x 0.2722
Halfife_1 1.10 min	
Halfife_2 5.76 min	

Tabla 15. Asociación Exponencial en dos fases (comprimidos).

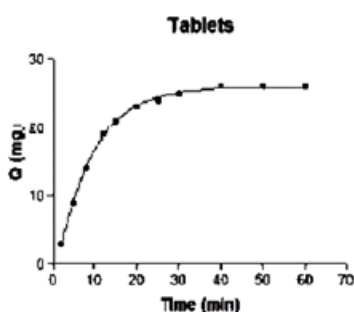


Figure 11: Perfil de disolución (n=6) de los comprimidos.

disolución. Este trabajo muestra que la presencia de algunos excipientes comúnmente utilizados en las suspensiones farmacéuticas, como polímeros (CMC), podría tener una influencia en el perfil de disolución de la formulación.

## 5. Conclusiones

Del análisis de los parámetros estudiados se concluye finalmente que las formulaciones líquidas orales de Ranitidina, Furosemida y Espironolactona investigadas, resultan sistemas estables durante 60 días. Dicha estabilidad es independiente de la temperatura, lo que indudablemente supondrá una ventaja en su conservación.

Estos hallazgos junto con los resultados de pH, reología, tamaño de partícula, y estabilidad óptica permiten garantizar una correcta dosificación y administración de los principios activos objeto de estudio, tanto en solución como en suspensión, si se trata de espironolactona.

Como sabemos, una terapéutica farmacológica efectiva, segura y racional en neonatos, infantes y niños requiere, no sólo de drogas eficaces sino de formas de dosificación adecuadas tanto

a las características físico-químicas del principio activo como a las peculiaridades fisiológicas del paciente.

En este sentido, cabe esperar, que el uso de estas formulaciones reducirá efectos secundarios derivados de errores en la dosificación, tiempo de almacenamiento, y/o administración.

A pesar de los buenos resultados, es necesario seguir trabajando en este campo para que estos y otros fármacos con evidencia clínica de eficacia en pediatría alcancen la condición de aceptados y registrados para su empleo en formulación magistral.

Entre tanto, queda garantizada la calidad y racionalidad de las formulaciones de Furosemida, Ranitidina y Espironolactona aquí estudiadas.

## 6. Agradecimientos

- Instituto Tecnológico del Medicamento Individualizado (ITMI)
- Comisión Permanente del Symposium Rafael Alvarez Colunga de Unificación de Criterios en Formulación Magistral Pediátrica.



## 7. Bibliografía

- [1] Malgor, V. Farmacocinética y Farmacodinamia en pediatría. *Farmacología pediátrica* 4, 77-87.
- [2] Standing JF, and C Tuleu. "Paediatric formulations--getting to the heart of the problem". *International Journal of Pharmaceutics*. 300 (1-2) (2005): 1-2
- [3] Allen, L. V. "Dosage form design and development". *Clinical Therapeutics*. 30 (11) (2008): 2102-2111.
- [4] Costello, Ian, Paul Long, Ian K. Wong, Catherine Tuleu, and Vincent Yeung. *Paediatric Drug Handling*. London and Chicago (2007): Pharmaceutical Press.
- [5] [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/childsize\\_medicines\\_20090121/es/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/childsize_medicines_20090121/es/index.html)
- [6] Regulation (EC) N<sup>o</sup> 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and amending Regulation (EC) No 1768/92, Directive 2001/20/EC, Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004.
- [7] European Commission (2008) Guideline on the format and content of applications for agreement or modification of a paediatric investigation plan and request for waivers or deferrals and concerning the operation of the compliance check and on criteria for assessing significant studies. 2008/C 243/01.
- [8] Brion F, Nunn AJ, Rieutord A. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European Hospitals. *Acta Paediatr* 2003; 92: 486-490.
- [9] Catálogo de medicamentos 2007. Colección Consejo Plus. Consejo general de Colegios Oficiales de Farmacéuticos Madrid 2007.
- [10] Kaukonen, AM, P Vuorela, H Vuorela, and JP Mannermaa. "High-performance Liquid Chromatography Methods for the Separation and Quantitation of Spironolactone and Its Degradation Products in Aqueous Formulations and of Its Metabolites in Rat Serum." *Journal of Chromatography*. a. 797 (1998): 1-2. Print.
- [11] Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products, CPMP/QWP/122/02, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2003).
- [12] Salgado, A.C., Rosa, M.L., Duarte, M.A., and Almeida, A.J. 2005. "Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations". *The European Journal of Hospital Pharmacy Science* Volume 11 Issue 3: 68- 73
- [13] [http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1191.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1191.html)
- [14] Espinosa Bosch M, Ruiz Sanchez AJ, Sanchez Rojas F, and Bosch Ojeda C. 2008. "Recent developments in analytical determination of furosemide". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 48 (3): 519-32.
- [15] European Pharmacopoeia. Edición vigente. EDQM (Strasbourg).
- [16] Farmacopea de los Estados Unidos de América-Formulario Nacional: USP 29-NF 24. United States Pharmacopoeial Convention. Rockville (Md.), 2006.
- [17] AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona. 2001
- [18] ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
- [19] David R. Long. 1991. Aqueous ranitidine compositions stabilized with ethanol. United States Patent 5,068,249. Nov.26.
- [20] Caricofe, Ralph Boyer. 2001. Aqueous ranitidine compositions comprising ranitidine and LCMT sucrose. United States Patent 6,265,449. Jul 24.
- [21] Keith Whitehead. 2006. Stabilized aqueous ranitidine composition. United States Patent Application Publication US 2006/0100271 A1. May 11.
- [22] Nagesh R. Palepu. 2007. Stable pharmaceutical compositions, processes for making the same and methods of their uses. United States Patent Application Publication US 2007/0190085 A1. Aug 16.
- [23] Ghanekar, AG, Gupta V. Das, and CW J. Gibbs. "Stability of Furosemide in Aqueous Systems." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 67.6 (1978): 808-11. Print.
- [24] Shah, Kirit A, V D. Gupta, and Kenneth R. Stewart. "Effect of Ph, Chlorobutanol, Cysteine Hydrochloride, Ethylenediaminetetraacetic Acid, Propylene Glycol, Sodium Metabisulfite, and Sodium Sulfite on Furosemide Stability in Aqueous Solutions." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69.5 (1980): 594-596.
- [25] dos Santos C. A, P.G Mazzola, B Polacwicz, M.C Knirsch, T.C.V Pena, and O Cholewa. "Stability of Furosemide and Aminophylline in Parenteral Solutions." *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47.1 (2011): 89-96. Print.
- [26] Pramari, Yashoda, and V D. Gupta. "Preformulation Studies of Spironolactone: Effect of Ph, Two Buffer Species, Ionic Strength, and Temperature on Stability." *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 80.6 (1991): 551-553. Print.
- [27] Pramari Y, Gupta VD, Zerai T. Quantitation of spironolactone in the presence of canrenone using high-performance liquid chromatography. *Drug Dev Ind Pharm*; 17 (1991): 747-61.
- [28] Schellart, W.P. "Rheology and density of glucose syrup and honey: Determining their suitability for usage in analogue and fluid dynamic models of geological processes". *Journal of Structural Geology* 33 (2011): 1079-1088. Print.
- [29] Lee, C.H, V Moturi, and Y Lee. "Thixotropic Property in Pharmaceutical Formulations." *Journal of Controlled Release*. 136.2 (2009): 88-98. Print.
- [30] Cancela, M. A., Álvarez, E and Maceiras R. "Effects of temperature and concentrations on carboxymethylcellulose with sucrose rheology". *Journal of Food Engineering* 71 (2005): 419-424.
- [31] Provenza N., Calpena A.C., Flo A., Halbaut L, Ruiz A, Clares B. "Dissolution profile of three oral formulations of spironolactone". *Revista portuguesa de Farmacia*. Volumen L11 (n<sup>o</sup>6) suplemento (2012): 107-108.
- [32] Kang, Q, D Zhang, S Chen, and X He. "Lattice Boltzmann Simulation of Chemical Dissolution in Porous Media." *Physical Review*. E, Statistical, Non-linear, and Soft Matter Physics. 65.3 (2002). Print.
- [33] Chen, Cheng, and Dongxiao Zhang. "Lattice Boltzmann Simulation of the Rise and Dissolution of Two-Dimensional Immiscible Droplets." *Physics of Fluids*. 21.10 (2009): 103301. Print. •



**RELACIÓN DE COMUNICACIONES EN FORMA DE PÓSTER Y  
COMUNICACIONES ORALES**





# Sildenafil oral liquid formulation

N. Provenza<sup>1</sup>; B. Clares<sup>2</sup>; L. Halbaut<sup>1</sup>; M. Mallandrich<sup>1</sup>; A. Sánchez<sup>1</sup>; A. Calpena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Barcelona, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Avda. Juan X XIII, 08028 Barcelona, Spain, [nora.provenza@hotmail.com](mailto:nora.provenza@hotmail.com), Tel. +34 93 402 45 60;

<sup>2</sup>University of Granada, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Campus de la Cartuja s/n c.p 18071 Granada, Spain, [beatrizclares@ugr.es](mailto:beatrizclares@ugr.es), Tel. +34 958 24 39 05;

## INTRODUCTION

Sildenafil (SDL) citrate is a phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor that selectively reduces pulmonary vascular resistance (1). The pharmacokinetic profile of oral SLD has not been formally evaluated in children. In adults has a bioavailability of approximately 40%. Maximum serum concentrations occur 0.5-2 hours after an oral dose administration. SLD is highly protein bound (96%) and extensively distributed throughout the body. It is metabolized via the hepatic cytochrome P450 enzyme system and it has an elimination half-life of approximately 4 h in adults (2).

Most common cause of pulmonary hypertension in the neonatal period is Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn (PPHN) (3). The PPHN is characterized by marked pulmonary hypertension resulting in a severe reduction in pulmonary blood flow and shunting from the pulmonary circulation into the systemic circulation. PPHN typically affects full-term and near-term neonates shortly after birth and occurs in 1–2 newborns per 1000 live births. Neonates with PPHN develop severe respiratory distress, refractory hypoxemia and acidosis. Despite significant improvements in treatment, this disorder causes substantial morbidity in newborns, with a mortality rate of about 10–20% (4, 5). PDE5 is the predominant phosphodiesterase isoform in the lung that metabolizes cGMP. Inhibition of PDE5 leads to increased concentration of cyclic-AMP and GMP locally, which in turn leads to relaxation of pulmonary vascular smooth muscles (1).

There are studies reporting its efficacy as an oral preparation in neonates with PPHN (2). Therefore, the aim of this work was to develop and study of the physic chemical stability of an oral solution of SDL (compounding formulation) for paediatric use and suitable also for diabetic patients. Study duration was 90 days and it was performed at three different temperatures (4, 25 and 40 °C). Microbiological stability was also assessed.

## EXPERIMENTAL METHODS

### Materials

The active substance SDL and the excipient Acofar® (EA) for syrup sugar free were purchased from Acofarma, S.A.

Double-distilled water was used after filtration in a Milli-Q® Gradient A10 system apparatus. All chemicals were of analytical grade.

Ingredients	Composition
Sildenafil (mg/mL)	0.2
Citrate buffer 0.1M (pH=4) (mL)	10
EA for syrups without sugar (mL)	45
Distilled water (mL)	q.s.

**Table 1. Oral sildenafil solution composition.**

### Stability study

Aliquots of 10 mL were stored in amber glass vials with chlorobutyl septum at 4, 25 and 40 °C. The following parameters were checked out:

- Organoleptic characters: appearance, colour and odour,
- Quantification of the active substance was measured at 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days by Spectrophotometry UV: Amersham Biosciences Ulrospect 1100 UV spectrophotometer (wavelength of 200.2 nm), linked to a computer equipped with the 8500 UV-Vis software.  
This method was validated by preparing 6 calibration standards at different days (interday validation). The main criteria of validation were linearity, precision, accuracy and detection and quantification limits.
- pH measurement was made at 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days using a Crisson pH-metre micropH 200, model 200.
- Rheology-Viscosity. The determination of viscosity was made at 0 and 90 to the samples stored at 25 °C.
- Microbiological studies. Microbiological tests of the suspensions were performed at 0 and 90 days according to the European Pharmacopoeia monograph, “*Microbiological examination of non-sterile products*” (6).

Data analysis:

Validation and statistically analysis (n=3) were carried out using the Prism® V. 3.00 software.

## RESULTS AND DISCUSSION.

### a) Organoleptic characteristics

At the beginning of the study (day 0), the solution was transparent, pink with strawberry smell. These characteristics were constant at 25 and 40 °C for 90 days. However at 4 °C, a precipitate, which did not re-dissolve with stirring, was observed from day 15.

### b) Quantification of the active substance

The analytical method for the assay of SLD (UV) was linear, accurate and precise in the range of concentrations from 50 µg/mL to 0.87 µg/mL. According to USP, concentrations of active substance within the interval ±10% of nominal value are acceptable.

	Solution of SLD (mg/mL)		
	4°C	25°C	40°C
Day 0	-	100.0 ± 0.4	-
Day 7	100.0 ± 1.1	100.9 ± 1.2	100.9 ± 1.0
Day 15	82.0 ± 0.9	96.4 ± 1.3	96.3 ± 0.1
Day 30	83.8 ± 0.1	101.9 ± 1.0	98.8 ± 1.6
Day 60	49.9 ± 0.6	68.9 ± 0.8	70.6 ± 1.6
Day 90	41.6 ± 1.7	70.0 ± 1.1	73.4 ± 1.3

**Table 2: SLD concentration in the solution along the study.**

As it is observed (Table 2), concentration of SLD is within the interval of acceptance for 30 days at 25 and 40 °C. At 4 °C it is stable for 7 days observing a decrease in the remaining concentration of SLD. This fact is coincident with the apparition of a precipitate as mentioned above.

### a) pH

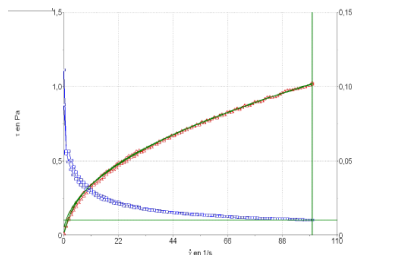
	4°C	25°C	40°C
Day 0	-	4.24	-
Day 7	4.47	4.43	4.42
Day 15	4.21	4.24	4.24
Day 30	4.20	4.30	4.32
Day 60	4.35	4.34	4.40

**Table 3: pH values averages for syrup with sugar at each temperature along the study.**

pH values were fairly constant along the study. One way ANOVA test showed that there were no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) regardless the storage temperature.

### a) Rheology-Viscosity

The curves for the SLD solution were slightly dependent on shear rate, showing a consistent decrease in viscosity with increasing shear rate from 0 to 100 s<sup>-1</sup>. This is the typical behaviour of pseudoplastic fluids. The hysteresis loop is inappreciable, which indicates that the formulation did not show thixotropy.



**Figure 1. Rheological behavior of the SLD formulation**

Viscosity value was 10.21 mPa·s at  $t_0$ . No significant differences were registered at the end of the study.

### b) Microbiological study

Results from the microbiological test showed that the formulation complied with the European Pharmacopoeia specifications on the microbial examination of non-sterile product at  $t=90$ .

## CONCLUSION

A solution of SLD suitable for paediatrics and also for diabetic patients has been developed. According to the obtained results it can be concluded that the formulation is physico-chemically and microbiologically stable for 7 days at 4 °C and at 30 days at 25 and 40 °C.

## REFERENCES

1. Michelakis E., Tymchak W., Lien D., et al. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 105, 2398-2403 (2002).
2. Buck M.L. Sildenafil for the treatment of pulmonary hypertension in children. *Pediatr Pharm* 10, 2 (2004).
3. S.A. Stayer. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 24, 375–386 (2010).
4. Konduri G.G, Solimano A. A randomized trial of early versus standard inhaled nitric oxide therapy in term and near-term newborn infants with hypoxic respiratory failure. *Pediatrics* 113, 559–564 (2004).
5. Walsh-Sukys M.C., Tyson J.E., Wright L.L. et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics* 105, 14–20 (2000).
6. European Pharmacopoeia 7.0. <http://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-publications-1401.html> (Accessed 10 October 2013).

## 97. Estudio de estabilidad de una formulación líquida oral de sildenafil para uso pediátrico

Provenza Bernal, N.; Clares Naveros, B.<sup>1</sup>; Mallandricht Miret, M.; Sánchez Milán, A. & Calpena Company, A.  
Universidad de Barcelona, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
<sup>1</sup>. Universidad de Granada, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
nora.provenza@hotmail.com

**Resumen:** El sildenafil (SLD) es un inhibidor de la fosfodiesterasa-5 utilizado en la disfunción eréctil. Estudios muestran la eficacia de preparaciones orales de SLD en hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN). El uso del SLD en HPPRN conlleva la elaboración de fórmulas magistrales orales líquidas que permitan el ajuste correcto de la dosis. Cualquier control de estabilidad o uniformidad de dosis requiere de técnicas analíticas específicas que suponen un sobreesfuerzo económico y de recursos a Hospitales que elaboran este tipo de preparados. Dada la ausencia de este tipo de estudios, el objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo y estudio de estabilidad de una formulación líquida oral de SLD, apta para uso pediátrico, de concentración 2 mg/ml.

**Material y métodos:** -FÓRMULA: Sildenafil Citrato 200 mg, 10 ml Tampón Citrato pH 4.2, 45ml excipiente Acofar® para jarabes, Agua destilada c.s.p. 100 ml.

El estudio de estabilidad se realizó durante 90 días. Se tomaron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio topacio cerrados

herméticamente y se almacenaron a 4 °C, 25 °C y 40 °C. A día 0, 7, 15, 30, 60 y 90 se evaluaron las características organolépticas, el pH y la concentración de principio activo (espectrofotometría UV a  $\lambda = 292,5$  nm). La estabilidad microbiológica y la viscosidad se midieron a día 0 y 90, a 25°C. Las preparaciones se consideraron estables si sus características físicas no se modificaban y si la concentración del principio activo se mantenía en el rango  $\pm 10\%$  de la concentración original.

**Resultados:** La fórmula resultó ser una suspensión color rosa pálido, casi incoloro y olor afrutado. Estas características se mantuvieron constantes a lo largo del estudio a todas las temperaturas. Se registraron valores de pH alrededor de 4,0 a lo largo de todo el estudio (pH de máxima solubilidad del SLD). La formulación presentó comportamiento de fluido newtoniano. Los resultados del análisis microbiológico mostraron que la fórmula cumple con lo especificado en la Farmacopea Europea.

The objective is to present a regulator's perspective of how such safety reviews arise and are evaluated and results disseminated to stakeholders.

**Method:**

A variety of information sources were used to collate information and allow classification of the data. These included the MHRA's internal database, academic papers, technical documents from professional bodies and correspondence with experts.

Following a clinical and quality (formulation) assessment, advice was obtained from the Commission of Human Medicines (CHM) and its Paediatric Medicines Expert Advisory Group (PMEAG).

**Results:**

CHM and the PMEAG recommended that the product information be updated with safety warnings regarding the content of SLS and its possible irritant effects on the skin. In addition, SLS should be clearly declared as an ingredient of Aqueous Cream products to allow healthcare professionals and patients to make informed choices about suitable emollients. Further measures included the publication of a Drug Safety Update and Patient Safety Article.

**Conclusion:**

Findings of this national review will feed into a wider safety review by the central European Medicines Agency. The Excipient Drafting Group is reviewing 20 excipients with a view to updating regulatory guidance on inclusion in medicinal products and appropriate warnings. The review of SLS, originally in the fourth wave, has now been accelerated. This presentation demonstrates the proactive nature of risk management of medicines and the interplay between a National Competent Authority and the central body.

**Poster No: 40**

INFLUENCE OF EXCIPIENTS COMMERCIALY AVAILABLE ON THE STABILITY OF PHARMACEUTICAL COMPOUNDING FOR PAEDIATRIC USE

N. Provenza<sup>1</sup>, M. Mallandrich<sup>1</sup>, B. Clares<sup>2</sup>, R. Sanz<sup>1</sup>, A.C. Calpena<sup>1</sup>

1Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Barcelona.

2Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada.

Corresponding author: nora.provenza@hotmail.com

Introduction: Many active substances are commercially available only as tablets. This continues to be an issue for some groups of population like paediatrics. Thus, pharmaceutical compounding is still an option in everyday patient healthcare but the lack of stability information is a common problem [1]. In pharmaceutical compounding, the compatibility of drugs with the excipients and the stability of the formulation must be considered.

**Purpose:** The aim of this study was to assess the influence of two excipients commercially available in Spain (Excipient Acofar® for Syrup and Excipient Acofar® for Syrup Sugar Free) on the stability of pharmaceutical compounding suitable for paediatric population.

**Materials and Methods:** Two formulations of each API were tested (one with Excipient Acofar® for Syrup and other with Excipient Acofar® for Syrup Sugar Free). Chosen APIs (as pure powder) were furosemide, phenobarbital (both formulated at pH>7) and captopril (formulated at pH<7). Also formulations without API were prepared as control. Aliquots were stored at 4, 25 and 40°C. During the 90-day period, the formulations were periodically (0, 7, 15, 30, 60 and 90 days) examined for the physical appearance, drug concentration by ultraviolet spectrophotometry and influence of pH and temperature. Rheological behavior was also assessed.

**Results:** At  $t_{90}$ , all the samples showed the same rheological behaviour as at  $t_0$ , regardless of the API. Changes in the appearance of the samples with pH>7 stored at 40 °C were observed. Thus, control samples (with and without sugar) showed similar physical behaviour, which did not change when API was present. However, in some cases, chemical stability of the API was different between excipients stored at the same temperature (i.e. at 25 °C, phenobarbital was stable for 30 days when formulated with Excipient Acofar for Syrup and 15 days when Excipient Acofar for Syrup Sugar Free was used).

**Conclusions:** Paediatric marketed excipients make easier the compounded preparation of oral liquids. However, the stability of the compounded preparation differs with the excipients. The study demonstrates that the excipients chosen may have a direct influence on the stability of the final preparation and also on its storage conditions. Hence it is important to carefully select the excipients for compounded preparations. Each formulation should be studied individually to ensure its quality and safety.

**References:**

1. Trissel LA Stability of Compounded formulations. Washington DC: American Pharmaceutical Association; 1996:1-296.

**Poster No: 54**

FUNCTIONALIZED CALCIUM CARBONATE AS A NOVEL PHARMACEUTICAL EXCIPIENT FOR THE PREPARATION OF ORALLY DISPERSIBLE TABLETS

**Tanja Stirnimann**<sup>1</sup>, Joachim Schoelkopf<sup>2</sup>, Daniel E. Gerard<sup>2</sup>, Rainer Alles<sup>1</sup>, Jörg Huwyler<sup>1</sup>, Maxim Puchkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Science, Division of Pharmaceutical Technology, University Basel, Klingelbergstrasse 50, 4056 Basel, Switzerland

<sup>2</sup> Omya AG, 4665 Oftringen, Switzerland

E-mail: [tanja.stirnimann@unibas.ch](mailto:tanja.stirnimann@unibas.ch)

Orally dispersible tablets (ODTs) constitute a solid, single-unit dosage form, which instantaneously disperse/dissolves in the mouth cavity. The easiest and most cost-effective technique to prepare ODTs is by direct compression. The tablets are often compacted at low pressures to ensure rapid

# ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE FÓRMULAS LÍQUIDAS ORALES DE METADONA.

M. Mallandrich<sup>1</sup>, N. Provenza<sup>1</sup>, B. Clares<sup>2</sup>, L. Halbaut<sup>1</sup>, F. Fernández<sup>1</sup>, A. Flo<sup>1</sup>, A.C. Calpena<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Barcelona. Barcelona, España

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada. Granada, España.

## Introducción:

En España, las formulaciones líquidas orales de Metadona están únicamente comercializadas para adultos. Los neonatos expuestos durante la gestación a ciertas sustancias, pueden desarrollar una dependencia física (1,2). La Metadona es el fármaco más prescrito para tratar este síndrome. No obstante, considerar al niño como si fuera un adulto pequeño puede llevar a grandes errores de dosificación de fármacos.

La falta de disponibilidad en el mercado farmacéutico de productos adaptados a las necesidades de la población pediátrica, y en especial, a las del neonato, conduce a la elaboración de fórmulas magistrales y éstas presentan una gran variabilidad en el diseño.

En nuestro entorno, son pocos los estudios que han valorado la utilización de fórmulas magistrales para el uso en pediatría. Es decir, que el mayor inconveniente para difundir estos fármacos es la falta de investigación no sólo a nivel clínico sino a nivel tecnológico.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la estabilidad de 2 soluciones orales de Metadona 0.2 mg/ml, una de ellas apta para diabéticos en 3 condiciones de almacenamiento (4, 25 y 40°C) durante 30 días.

## Materiales y Métodos:

### Materiales

La Metadona fue adquirida a través de la Agencia Española del Medicamento de acuerdo con la normativa vigente.

El resto de excipientes fueron proporcionados por Acofarma S.A.

La composición de las soluciones orales de Metadona estudiadas se muestra en la tabla 1.

	Solution 1	Solution 2
Metadona hidrocloreuro	0.2 mg/mL	0.2 mg/mL
Agua	50 %	50 %
Excipiente 1	50 %	-
Excipiente 2 *	-	50 %

**Tabla 1.** Composición de las fórmulas líquidas orales de Metadona. \* Excipiente 2: apto para diabéticos.

### Método analítico

El método analítico fue validado a partir de 6 rectas de calibración, preparadas en días diferentes (validación interdía). Como criterios fundamentales de validación se utilizaron la linealidad, precisión, exactitud y los límites de detección y de cuantificación (3).

La cuantificación de principio activo se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): cromatógrafo Waters 600C acoplado Autosampler Waters 717 plus. Detector Photodiode Waters 2996 ajustado a 220nm, columna Mediterranea Sea18, 5µmm 25 x 0.46 mm, flujo de 1ml/min, la fase móvil estaba compuesta por una mezcla de Acetato de amonio 0.025M: Acetonitrilo (20:80).

### Estudio de estabilidad

Alícuotas de 20 ml de cada una de las formulaciones fueron almacenadas en frascos de vidrio topacio a las diferentes condiciones de temperatura, 4, 25 y 40°C. El periodo de estudio comprendió 1 mes. Los ensayos fueron realizados a 0, 7, 15 y 30 días. Se monitorizaron los siguientes parámetros:

- Características organolépticas: aspecto, color y olor.
- Cuantificación de principio activo: de ambas fórmulas.
- pH: se realizó un seguimiento de pH mediante el pHmetro Crison micropH 200.
- Determinación de la viscosidad: mediante Haake Rheometer Rheo Stress 1, usando una geometría plato-plato.

### Análisis estadístico:

El número de determinaciones efectuadas por fórmula, tiempo y temperatura fueron 6. Se calcularon los valores medios y la desviación estándar. Con objeto de comprobar si existen diferencias significativas entre las medias comparadas, todos los resultados se sometieron a un tratamiento estadístico ANOVA para un nivel de confianza del 95 %.

## Resultados y Discusión:

### Método analítico:

### Validación:

El método analítico desarrollado resultó ser lineal, preciso y exacto en el rango de

concentraciones de Metadona de 1.76-20 µg/ml. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.46 y 1.38 µg/ml respectivamente.

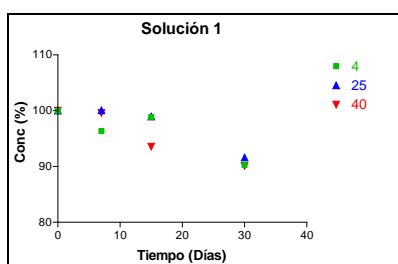
Estudio de Estabilidad:

Características Organolépticas:

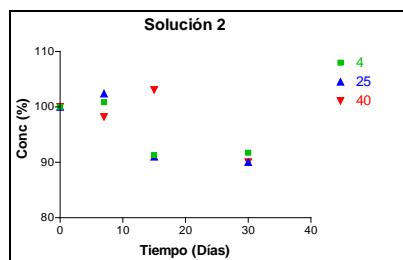
Al inicio del estudio, todas las soluciones resultaron transparentes, de color rosado y olor a fresa. Estas características se mantuvieron hasta el día 30.

Cuantificación del principio activo:

En las gráficas 1 y 2 se muestran la evolución de la concentración de Metadona determinada para cada una de las fórmulas ensayadas en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento.



**Figura 1.** Concentración de Metadona en la Solución 1 expresado en porcentaje respecto a la concentración inicial de día 0.



**Figura 2.** Concentración de Metadona en la Solución 2 expresado en porcentaje respecto a la concentración inicial de día 0.

En ambas soluciones la concentración de Metadona se mantuvo dentro del intervalo  $\pm 10\%$  durante 30 días en todas las condiciones de almacenamiento.

Estudio de pH:

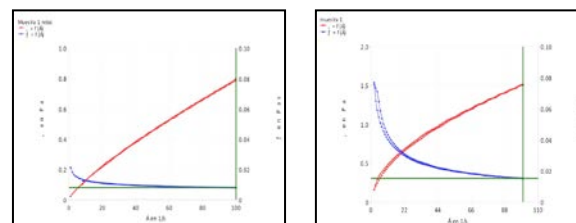
El pH de ambas soluciones no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo en ninguna de las condiciones de temperatura de conservación.

Estudio reológico:

En la figura 3 se muestran las curvas de flujo y curvas de viscosidad para cada una de las formulaciones estudiadas. La gráfica muestra un comportamiento Newtoniano para la Solución 1; frente a un comportamiento pseudoplástico para la solución 2. Desde el punto de vista

tecnológico este último sería más adecuado para la administración de un jarabe pediátrico. Se ha comprobado como un aumento de la viscosidad tras la adición de modificadores reológicos como gomas o carbohidratos puede reducir la difusión de sustancias amargas de la saiva a las papilas gustativas (4).

Los valores de viscosidad hallados para la Solución 1 fueron de  $7.99 \pm 0.11$  a día 0 y de  $7.84 \pm 0.05$  a día 30. La Solución 2, a día 0 el valor de viscosidad fue de  $15.12 \pm 0.02$  y de  $14.94 \pm 0.05$  a día 30.



**Figura 3.** Gráficas de viscosidad. Izquierda, Solución 1. Derecha, Solución 2.

**Conclusiones:**

Los resultados obtenidos indican que las soluciones de Metadona objeto de estudio fueron estables durante 30 días sin cambios significativos por causa de la temperatura. Así mismo mostraron valores constantes y adecuados de pH y viscosidad en función del tiempo.

**Referencias:**

- (1) <http://www.sepeap.org/archivos/revisiones/neonatologia/abstinencianeonatal.htm>
- (2) University of the Sciences in Philadelphia. Philadelphia College of Pharmacy. *Neonatal Pharmacotherapy. Neonatal Abstinence Syndrome.* Philadelphia College of Pharmacy Reports, 2003; 3(3): 3-35
- (3) Aguirre, O. L., Pérez, C. J. A., & Pujol, F. M. *Validación de métodos analíticos.* Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 2001.
- (4) Rathbore, M.J., Helgraff, J. *Drugs and pharmaceutical Sciences in drug delivery technology.* Marcel Dekker, New York, 2003; 126: 191-202.

**Agradecimientos:**

- Acofarma S.A.



## ORAL LIQUID FORMULATIONS OF METHADONE

N. Provenza, A.C. Calpena, L. Halbaut, M. Mallandrich, M. Fernández, A. Ruiz<sup>1</sup>, B. Clares<sup>1</sup>, B. Pueyo

University of Barcelona, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Avda. Juan X XIII, 08028 Barcelona, Spain, Tel. +34 93 402 45 60, email: [nora.provenza@hotmail.com](mailto:nora.provenza@hotmail.com).

<sup>1</sup>University of Granada, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Campus de la Cartuja s/n c.p 18071 Granada, Spain, Tel. +34 958 24 39 05, email: [beatrizclares@ugr.es](mailto:beatrizclares@ugr.es).

### INTRODUCTION

Methadone maintenance treatment is the most widely available pharmacotherapy for opioid addiction [1].

In Spain, oral liquid formulation of Methadone is commercially available only for adults, but it should be taken into account that infants exposed to certain drugs in uterus may become physically dependent on them, and after birth suffer withdrawal symptoms, called the Neonatal Abstinence Syndrome (NAS). [2-5]. Between 30% and 80% of infants exposed to opiates in uterus require treatment for NAS. Methadone is one of the most commonly prescribed opioids to treat this Syndrome. [6]

The clinical presentation of NAS depends on several factors, including the drug (or drugs) to which the neonate was exposed, the timing and the amount of the last maternal use, the maternal and infant metabolism and excretions. [2-4,7].

Regarding adults, even if there is an oral liquid presentation commercially available in the Spanish market, it is very common to prepare liquid preparations of methadone as part of the detoxification programs (i.e. when it is necessary a more accurate of the dose or in case of special population like diabetics, etc) in hospitals or chemists. This fact together with the absence of infant presentations in the market leads to the use of Pharmaceutical Compounding.

The design of effective liquid formulations for drugs has been a major challenge, due to, i.e. the instability or poor solubility of the active substance in the vehicle. In this case, it should be taken into account also the bitter taste of methadone.

Therefore, the aim of this work was to study the stability of two oral solutions of Methadone of 0.2 mg/mL: one of them with sugar (solution 1) and the other without sugar (solution 2) at three different temperatures (4, 25 and 40°C) for diabetic patients.

### EXPERIMENTAL METHODS

#### Materials

The active substance (Methadone) was obtained through the corresponding procedure with the Spanish Health Authorities.

The other raw materials were supplied by Acofarma, S.C.L (Barcelona, Spain).

Table 1: Different oral solutions of Methadone object of study:

	Solution 1	Solution 2
Methadone hydrochloride	0.2 mg/mL	0.2 mg/mL
Water	50%	50%
EA for oral suspension	25%	25%
EA for syrups	25%	-
EA for syrups without sugar	-	25%

EA: Excipient Acofarma

#### Stability study

Aliquots of 10 ml were stored in amber glass vials with chlorobutyl septum at 4, 25 and 40°C. The following parameters were checked out:

- Organoleptic characters: appearance, colour and odour,
- Quantification of the active substance was measured at 0, 7, 15, 30 and 60 days by Spectrophotometry UV: Amersham Biosciences Ulrospect 1100 UV spectrophotometer (wavelength of 200.2 nm), linked to a computer equipped with the 8500 UV-Vis software.  
  
This method was validated by preparing 6 calibration standards at different days (interday validation). The main criteria of validation were linearity, precision, accuracy and detection and quantification limits.
- pH. pH measurement was made at 0, 7, 15, 30 and 60 days using a Crisson pH-metre micropH 200, model 200.
- Reology-Viscosity. The determination of viscosity was made at 0 and 30 to the samples stored at 25°C.

Data analysis:

Validation and statistically analysis (n=3) were carried out using the software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### a) Organoleptic characteristics

At the beginning of the study (day 0), all the solutions were transparent, pink and with strawberry smell. These characteristics were constant at all temperatures until day 60.

### b) Quantification of the active substance

According to USP, concentrations of active substance within the interval  $\pm 10\%$  of nominal value are acceptable.

Table 2: Concentration values for solution with sugar.

	Solution 1 (mg/mL)		
	4°C	25°C	40°C
Day 0		0.21	
Day 7	0.22	0.22	0.22
Day 15	0.22	0.19	0.20
Day 30	0.20	0.22	0.21
Day 60	0.21	0.22	0.18

Table 3: Concentration values for sugar free solution

	Solution 2 (mg/mL)		
	4°C	25°C	40°C
Day 0		0.21	
Day 7	0.20	0.18	0.22
Day 15	0.21	0.21	0.22
Day 30	0.21	0.20	0.21
Day 60	0.20	0.21	0.21

As it is observed, concentration of methadone is constant along the study in both solutions, regardless the temperature of storage.

### c) pH

Table 4: pH values averages for solution with sugar at each temperature along the study.

	4°C	25°C	40°C
Day 0		4.46	
Day 7	4.47	4.43	4.41
Day 15	4.38	4.31	4.39
Day 30	4.41	4.40	4.47
Day 60	4.31	4.35	4.38

Table 5: pH values averages for sugar free solution at each temperature along the study.

	4°C	25°C	40°C
Day 0		4.71	
Day 7	4.72	4.70	4.70
Day 15	4.70	4.59	4.67
Day 30	4.77	4.67	4.68
Day 60	4.70	4.69	4.68

In all cases pH values were constant along the study regardless of the storage temperature, with no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ).

### d) Reology-Viscosity

Solution with sugar is a nearly Newtonian fluid with a slightly pseudoplastic behavior, as its viscosity is not at all constant when the shear speed varies between 0 and  $100 \text{ s}^{-1}$ .

Sugar free solution has a pseudoplastic behavior as the viscosity increases with increasing shear gradient. Furthermore, the flow is not thixotropic as ascending and descending sections of rheogram match.

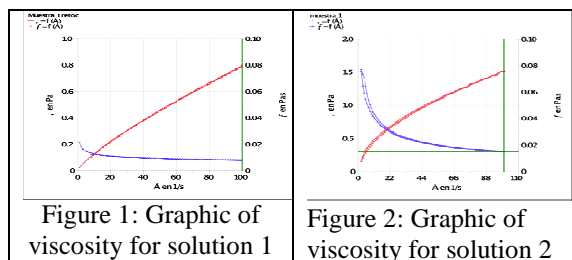


Figure 1: Graphic of viscosity for solution 1

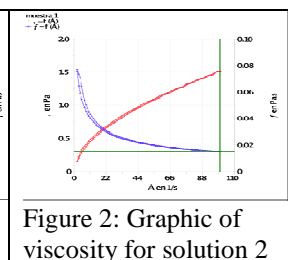


Figure 2: Graphic of viscosity for solution 2

Table 6: Average viscosity values (mPa).

	Day 0	Day 30
Solution 1	$7.99 \pm 0.1153$	$7.84 \pm 0.0465$
Solution 2	$15.12 \pm 0.0212$	$14.94 \pm 0.0470$

Viscosity values are constant along the study in both solutions.

## CONCLUSION

All the checked parameters (concentration of methadone in the solutions, pH and viscosity) were constant along the study, so it can be concluded that both methadone solutions (with and without sugar) are stable for 60 days regardless the temperature of storage.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] Kreek, MJ, L Borg, E Ducat, and B Ray. "Pharmacotherapy in the Treatment of Addiction: Methadone." *Journal of Addictive Diseases*. 29.2 (2010): 200-16.
- [2] Committee on Drugs. *Neonatal Drug Withdrawal*. Pediatrics, 1998; 101(6): 1079-1088.
- [3] Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria. *Manejo del hijo de madre adicta a drogas*.
- [4] University of the Sciences in Philadelphia. Philadelphia College of Pharmacy. *Neonatal Pharmacotherapy. Neonatal Abstinence Syndrome*. Philadelphia College of Pharmacy Reports, 2003; 3(3): 3-35.
- [5] Western Australian Centre for Evidence Based Nursing & Midwifery. *Guideline for the Management of the Infant with Neonatal Abstinence Syndrome*. January 2007.
- [6] Johnson, K.; Gerada, C.; Greenough, A. *Treatment of neonatal abstinence syndrome*. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal, 2003; 88: 2-5.
- [7] Rosen, T.S.; Pippenger, C.E. *Pharmacologic observations on the neonatal withdrawal syndrome*. The Journal of pediatrics, 1976 Jun; 88(6): 1044-1048.
- [8] Woules, T.A.; Woodward, L.J. *Maternal methadone dose during pregnancy and infant clinical outcome*. Neurotoxicology and Teratology, 2010; 32(3): 406-413.

## ACKNOWLEDGMENTS

ITMI for their support and ACOFARMA, S.A for the raw materials.

## 48. Atención Farmacéutica en conservación de medicamentos en nevera

Casas Gálvez I<sup>1</sup>, Díaz-Guardamino Munt M<sup>2</sup>

1 Titular Oficina de Farmacia Isabel Casas. Madrid. (casasisabel@terra.es)

2 Farmacéutica Adjunta Oficina de Farmacia Arrazola. San Sebastián (guadaminomaria@gmail.com)

**Objetivos:** realizar un protocolo de actuación en medicamentos dispensados en oficina de farmacia que necesitan una conservación en nevera. Valorar los conocimientos de los pacientes en cuanto a conservación de medicamentos que requieren refrigeración y darles la información adecuada.

**Material y métodos:** entre los meses de Mayo 2011 a Octubre 2011 se realiza un protocolo de actuación y un estudio descriptivo en una oficina de farmacia. Se incluye a todo paciente al que se vaya a dispensar un medicamento que necesite ser refrigerado en algún momento de su vida útil.

**Resultados:** se obtuvieron 69 hojas de recogida de datos. La participación fue de un 79% de mujeres y un 21% de hombres. Los pacientes de entre 36-65 años son los que más demandan este tipo de medicamentos. De entre los medicamentos que necesitan refrigeración previa a su uso el 85% de los pacientes los conservan en nevera, de ellos el 44% lo guarda en la parte central del refrigerador (zona de óptima conservación) y la

mayoría sabe si debe tenerlo en la nevera una vez abierto o no. Entre los medicamentos que necesitan refrigeración únicamente una vez en uso se observó que el 82% mantenía su medicamento refrigerado pero solo un 29% lo hacía en el lugar adecuado.

**Discusión:** pese a que muchos de los pacientes en general saben cómo deben conservar los medicamentos de nevera, se observa una necesidad de formar más especialmente a los que adquieren medicamentos que requieren frío durante su uso y formación específica sobre conservación de medicamentos como vacunas, insulinas, colirios, lactobacillus en polvo y antibióticos.

**Conclusiones:** la tabla-protocolo de conservación de medicamentos en nevera es una herramienta de gran utilidad para una dispensación segura y responsable. Se ha observado de forma indirecta la necesidad y demanda de educación sanitaria en conservación de medicamentos.

## 49. Estudio de estabilidad de dos soluciones orales de furosemida

N. Provenza, L. Halbaut, A. Ruiz<sup>1</sup>, A. Flo, M. Mallandrich, C. Bau<sup>2</sup>, B. Clares<sup>1</sup>, A.C. Calpena. Universidad de Barcelona, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Avda. Juan X XIII, 08028 Barcelona, Spain, nora.provenza@hotmail.com. 1. Universidad de Granada, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain, beatrizclares@ugr.es. 2. Acofarma, Polígono Sta. Margarida, Calle Llobregat 20, 08223 Tarrasa, Barcelona

**Objetivo:** la furosemida es un diurético de asa de la familia de las sulfonamidas. En España se encuentra en comprimidos, solución inyectable y solución para perfusión. Esto conlleva a la elaboración de fórmulas magistrales líquidas de uso oral. Se utiliza ampliamente en los hospitales donde la dosis a administrar al paciente pediátrico debe estar pautada previamente según su peso, edad y estado de salud. Este trabajo pretende determinar la estabilidad de dos fórmulas líquidas de furosemida en bases para jarabes comerciales.

**Material y métodos:** todos los materiales de partida fueron aportados por Acofarma, S.A (Barcelona). Fórmulas: A. Furosemida 2mg/ml; tampón pH=9.8: 10%; Excipiente Acofar Jarabe c.s.p 100 ml. B. Furosemida 2mg/ml; tampón pH=9.8: 10%; Excipiente Acofar Jarabe sin azúcar c.s.p 100 ml. Alícuotas de 10 ml se almacenaron en viales de vidrio topacio con tapón de clorobutilo a 4, 25 y 40°C. A 0, 7, 15, 30 y 60 días se evaluaron las características organolépticas (aspecto, color,

olor), la cuantificación del principio activo (mediante espectrofotometría UV a  $\lambda = 271,5\text{nm}$ ) y el pH. La viscosidad se controló a 0 y 30 días a temperatura 25°C. El estudio estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism 3.

**Resultados:** la fórmula A se mantiene estable 30 días a todas temperaturas (concentración dentro del intervalo +/- 10% del valor nominal). El pH se mantiene constante a 4°C observándose un ligero descenso conforme aumenta la temperatura. El estudio de viscosidad muestra que la fórmula A es de tipo newtoniano mientras que la fórmula B es de tipo pseudoplástico. Respecto a las características organolépticas, ambas fórmulas presentan a 40°C un cambio en su coloración pasando de una tonalidad rosácea clara a un color amarillo anaranjado intenso a los pocos días de su preparación. Este efecto puede ser debido a cambios producidos en los excipientes utilizados en medio básico.

## DISSOLUTION PROFILE OF THREE ORAL FORMULATIONS OF SPIRONOLACTONE

N. Provenza<sup>1</sup>, A.C. Calpena<sup>1</sup>, A. Flo<sup>1</sup>, L. Halbaut<sup>1</sup>, C. Gutierrez<sup>1</sup>, A. Ruiz<sup>2</sup>, B. Clares<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Barcelona. Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of Granada. Granada, Spain

### INTRODUCTION

Spiroinolactone is a very well known diuretic, very poorly soluble in aqueous vehicles. In adults, it is used for the treatment of hyperaldosteronism, nephrotic syndrome and edematous conditions of congestive heart failure. In neonates, infants and children, it is used for the treatment of congestive heart failure secondary to congenital heart disease (1). In Spain, it is commercially available only in tablets, which is an inconvenient for persons that cannot swallow (either because they are ancient and/or because they have a serious pathology, which causes dysphagia) and for children who need a more accurate adjustment of the dose due to their pharmacokinetic and pharmacodynamic differences in respect to adults.

In those cases, the choice of an adequate pharmaceutical form is very important to guarantee the right administration, dosage adjustment and therapeutic adherence.

The absence of oral liquid presentation in the market leads to the use of Pharmaceutical Compounding (mainly solutions or suspensions). The design of effective liquid formulations for drugs has long been a major challenge, as drug efficacy could be severely limited by instability or poor solubility in the vehicle.

Therefore, the aim of this work was to study the dissolution profiles of three oral formulations of spiroinolactone and their comparison with the dissolution profile of the marketed tablets.

### MATERIAL AND METHODS

**Suspensions:** The suspensions have been elaborated under standard conditions. Their composition is shown in the following tables:

**Table 1. Formula 1**

Spiroinolactone	0.5%
Simple syrup	q.s. 100 ml

**Table 2. Formula 2**

Spiroinolactone	0.5%
Glycerine	10%
Simple syrup	q.s. 100 ml

**Table 3. Formula 3**

Spiroinolactone	0.5%
Glycerine	10%
Carboximethylcellulose (CMC)	0.2%
Simple syrup	q.s. 100 ml

5 ml of syrup (25 mg of spiroinolactone) were taken for each dissolution test.

**Tablets:** 25 mg spiroinolactone film coated tablets (Aldactone®)

#### Dissolution test (2):

- Apparatus 2 (Paddle apparatus) at 75 rpm
- Time: 60 minutes
- Sampling:
  - Tablets: 2, 5, 8, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 minutes
  - Syrups: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 60 minutes.
- Dissolution medium: 0.1N hydrochloric acid containing 0.1% of sodium lauryl sulfate.
- Temperature: 36 °C

**Analytical studies:** The concentration of each sample was obtained by UV spectrophotometry. The analytical method was previously validated (3) for precision, accuracy, and linearity. The equipment used was a spectrophotometer UV Amersham Biosciences. Model Ultrospec 1100, acoplado to a computer provided with a UV-Vis 8500 software at the wavelength of 242 nm.

#### Fitting method (GraphPad Prism 3):

Different models were assayed. Some of them are shown in the following table.

**Table 4. Examples for adjustment models**

One phase exponential association	$Y = Y_{max} \cdot (1 - e^{-kX})$
Two-phase association model	$Y = Y_{max1} \cdot (1 - e^{-k_1X}) + Y_{max2} \cdot (1 - e^{-k_2X})$
Boltzman sigmoid	$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + \exp\left(\frac{V50 - X}{Slope}\right)}$

The method was linear, accurate and precise between the range of concentrations from 0.78 to 25 µg/ml. Quantification limit was 3.92±0.65 µg/ml.

Formulas 1 and 2 were dissolved almost immediately, not being this the case of formula 3, which took around 10 minutes to achieve the maximum concentration of active substance. That is the reason why comparison between formula 3 and the marketed tablets was done.

**Table 4.** Amodelistic parameters

AMODELISTIC PARAMETERS			
FORMULATIO N	MDT (min)	AUC (mg min)	EFFICAC Y (%)
TABLET	10.2	1317.8	82.9
SYRUP (FORMULA 3)	4.8	1403.0	91.8

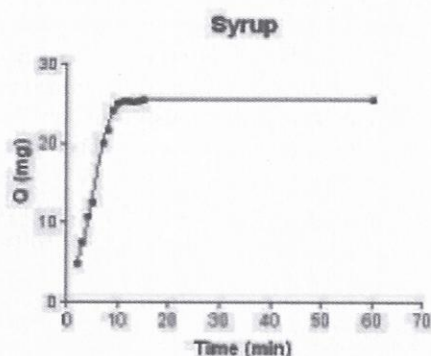
As it was expected, the mean dissolution time was higher and the efficacy was lower for tablets than for syrups.

Coefficient of determination ( $R^2$ ) was used as a discriminative procedure to determine the model that best explained the dissolution profile.

For syrup, the model that adjusted better to the obtained data was Boltzmann sigmoid.

**Table 5.** Boltzmann sigmoid (syrups)

BEST FIT VALUES		GOODNESS OF FIT	
Bottom	2.33 mg	Degrees of Freed	10
Top	25.61 mg	$R^2$	0.9967
V50	5.16 min	Absolute sum of squares	2.481
Slope	1.61 min	Sy.x	0.4981

**Graphic 1-** Mean Dissolution profile (n=6) for syrup.

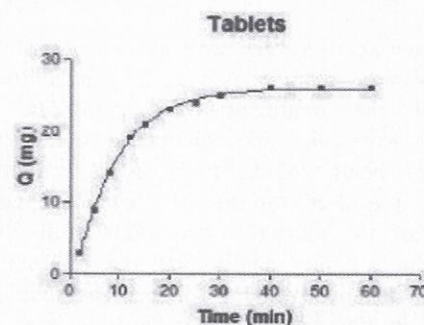
In general, Boltzmann model is used for simulating the transport and reaction of fluids in porous media (4). In this case, probably the polymer (CMC) performs a similar function to the porous matrices and, therefore, presents the same model. Other authors (5) used a coupled multiphase lattice Boltzmann model to simulate the dissolution of immiscible liquid droplets in another liquid during the rising process resulting from buoyancy.

However, for tablets, a two phase exponential association was the model that adjusted better to the obtained data. A two-phase model is used when the outcome measured is the result of the sum of a fast and a slow exponential decay.

In our case, it could be due to the quick dissolution of the film coat of the tablets at the beginning and a subsequent slow disintegration due to the excipients (calcium sulphate or corn starch) that limits the dissolution process.

**Table 6.** Two phase exponential association (tablets)

BEST FIT VALUES		GOODNESS OF FIT	
YMAX1	-5.20 mg	Degrees of Freed	7
K1	0.62 min <sup>-1</sup>	$R^2$	0.9991
YMAX2	31.18 mg	Absolut sum of squares	0.5188
K2	0.12 min <sup>-1</sup>	Sy.x	0.2722
Halflife_1	1.10 min		
Halflife_2	5.76 min		

**Graphic 2-** Mean Dissolution profile (n=6) for tablets-two phase model.

## CONCLUSIONS

Both formulations have different kinetic dissolution profiles. Between tablet and syrup, as it was expected, syrup is the one having a lower Mean Dissolution Time. Furthermore, this work show that the presence of some excipients commonly used in the pharmaceutical suspensions, like polymers (CMC), could have an influence in the dissolution profile of the formulation.

## REFERENCES

### Book Chapter:

- [1] Salgado AC et al. The European Journal of Hospital Pharmacy Science. 11. 68 - 73. 2005
- [2] Validación de métodos analíticos. AEFI. 2001.
- [3] United States Pharmacopeia (USP) and the National Formulary (NF) <711>. Current edition.
- [4] Kang, Q et al. Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. 65.3, 2002.
- [5] Chen, Cheng, et al. Physics of Fluids. 21.10, 2009.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to the ITMI for their support.

Villagrasa<sup>(2)</sup>, Purificación Broto Coscolluela<sup>(3)</sup>, M<sup>a</sup> Flor Sebastián Bonel<sup>(3)</sup>, Carlos Pardo Martínez<sup>(3)</sup> y Gerardo Rodríguez Martínez<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Hospital Infantil Miguel Servet, Zaragoza, <sup>(2)</sup>Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza y <sup>(3)</sup>Centro de Salud Perpetuo Socorro, Huesca

**Introducción y objetivos:** El porcentaje de tasa de abandono de lactancia materna en nuestro medio es alto y similar al resto de España pese a los beneficios que aporta, las recomendaciones institucionales y el esfuerzo del personal sanitario. Se pretende evaluar la efectividad de un programa de intervención diseñado para fomentar la LM desde atención primaria (AP) y estimar el ahorro conseguido al implantar dicho programa.

**Material y métodos:** Estudio de intervención en madres y recién nacidos (RN) durante el año 2006 pertenecientes a un Área de Salud de AP (N=146). El grupo control eran los RN en 2005 seguidos en esa Centro de Salud por el mismo personal (N=169). Todos los niños recibieron controles rutinarios de puericultura durante 2 años. El grupo intervención fue sometido a un programa educacional de apoyo a la LM focalizado en dos momentos clave en el abandono de la LM: los primeros 4-5 días de vida y 3er-4º mes. Se registraron distintas variables demográficas, obstétricas y perinatales así como las relacionadas con la duración de la LM. Además se cuantificó el coste económico de un niño durante los seis primeros meses de vida alimentado con leche de fórmula.

**Resultados:** Con el programa diseñado se consigue que el 80% de los recién nacidos sean revisados en AP 5 días antes en el grupo intervención que en el control. Existe una mejora en la prevalencia y mantenimiento de lactancia materna, sobre todo a partir del tercer mes de vida con diferencias de hasta un 16% a los seis meses de vida. Además existe una mayor prevalencia de lactancia materna exclusiva en el grupo intervención con respecto al grupo control, especialmente entre los 3 y 6 meses, existiendo diferencias del 8% al llegar al sexto mes y se consigue que las familias de esta muestra hayan ahorrado en conjunto casi 8.500€.

**Conclusión:** Se ha conseguido adelantar la primera revisión de los RN en AP 5 días mejorando la prevalencia de LM exclusiva y del mantenimiento total de la misma y ahorrando casi 8500€.

10:00

15

## UNIFICACIÓN DE CRITERIOS PARA LA ELABORACIÓN DE FÓRMULAS MAGISTRALES PEDIÁTRICAS.

Beatriz Clares Naveros<sup>(1)</sup>, José Manuel Manzaneros Olivares<sup>(1)</sup>, María Jesús Lucero Muñoz<sup>(2)</sup>, Concepción Álvarez del Vayo<sup>(2)</sup>, Manuela Atienza Fernández<sup>(2)</sup>, Ana Vila García<sup>(1)</sup>, María Adolfinia Ruiz Martínez<sup>(1)</sup>, Nora Provenza Bernal<sup>(3)</sup>, María Dolores Ruiz López<sup>(1)</sup> y Ana Cristina Calpena Campmany<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidad de Granada, Granada, <sup>(2)</sup>Universidad de Sevilla, Sevilla y <sup>(3)</sup>Universitat de Barcelona, Barcelona

La ausencia de presentaciones adaptadas a las necesidades de los niños, conlleva al uso de la formulación magistral, mediante la elaboración de soluciones o suspensiones, fuentes de posibles errores de preparación y administración. De hecho la variabilidad en el diseño de fórmulas magistrales y el inconveniente de menor estabilidad de las formas líquidas conlleva la posibilidad de efectos terapéuticos no comparables y errores de medicación en el manejo de las dosificaciones. Con motivo de superar estos inconvenientes nuestro objetivo ha sido la unificación de criterios en la elaboración de las formulaciones orales líquidas pediátricas más demandadas en hospitales u oficinas de farmacia del territorio nacional, así como el estudio de su estabilidad.

Para la realización de este trabajo se acuerda la creación de una Comisión Permanente Multidisciplinar en la que participan Colegios Oficiales, Hospitales, Facultades, Servicios comunitarios, Asociaciones...

Se validan los métodos analíticos (espectrofotometría o cromatografía líquida de alta resolución, según proceda) y se determina la concentración de activo en función de diferentes variables como tiempo, humedad, luz, pH y temperatura. Paralelamente las preparaciones son caracterizadas mediante multiple light scattering y determinación reológica. Los principios activos seleccionados así como las formulaciones más frecuentemente elaboradas en los servicios farmacéuticos hospitalarios consultados se muestran en la tabla.

Hasta el momento se confirma una estabilidad de 30 días para espironolactona, 40 días a 4°C para Captopril, 60 días para ranitidina, furosemda, y 90 días a 4°C para propanolol.

Con los datos obtenidos en este trabajo, se podría establecer un criterio único de formulación, conservación y dosificación, garantizando la continuidad, calidad y eficacia de tratamientos pediátricos. Asimismo se prevee la difusión de los resultados a los servicios farmacéuticos españoles así como su presentación ante la autoridad competente a efectos de su inclusión en la próxima actualización del Formulario Nacional como Fórmulas Magistrales Tipificadas o Preparados Oficiales según proceda.

**Título tabla:** Formulaciones Pediátricas Preseleccionadas para la Unificación de Criterios

Principio activo	Excipientes
Ranitidina 15mg/ml	Jarabe simple 50ml Agua purificada c.s.p. 100ml
Espironolactona 5mg/ml	Alcohol 70° 1ml Jarabe simple c.s.p. 100ml
Propanolol 1mg/ml	Acido cítrico monohidratado 1mg/ml Agua conservans 20ml Jarabe simple c.s.p. 100ml
Enalapril 1mg/ml	Solución reguladora de pH 3-3,5 300mg Jarabe simple c.s.p. 100ml
Captopril 1mg/ml	Edetato disódico 100mg Agua purificada c.s.p. 100ml
Furosemda 2mg/ml	Metil paraben 68mg Propil paraben 34mg Sodio Fosfato 12 Hidratos 6840mg Acido cítrico monohidratado 58mg Jarabe simple 40ml Agua purificada c.s.p. 100ml
Hidroclorotiazida 2mg/ml	Hidroxipropimetilcelulosa 1g Acido cítrico monohidrato c.s pH 3 Jarabe simple c.s.p. 100ml
Omeprazol 2mg/ml	Bicarbonato sódico 8.4g Goma xantan sol acuosa 1% 50ml Esencia vainilla 400mg Sacarina sódica 100mg Agua purificada csp 100ml
Fenobarbital sódico 328.5 mg	Glicerina 20ml Sorbitol 30ml Agua conservans csp 100ml
Acido ursodesoxicólico 20mg/ml	Metil celulosa 500mg Jarabe simple c.s.p 100ml
Isoniazida 10mg/ml	Sorbitol 70 % 50ml Agua consevans c.s.p. 100ml
Griseofulvina 25 mg/ml	Alcohol 96° 0.3ml Docusato sódico 500mg Hidróxido sódico 1M c.s pH 5.5-7.5 Carboximetilcelulosa sódica 1% 50ml Jarabe simple c.s.p.100ml
Tacrolimus 1mg/ml	Carboximetilcelulosa 1% 50ml Jarabe simple c.s.p. 100ml
Gabapentina 100mg/ml	Solución de Metilcelulosa 1 % 50ml Jarabe simple c.s.p.100ml
Hidrocortisona 1mg/ml	Alcohol 70° 10ml Glicerina 10ml Jarabe simple c.s.p. 100ml

# CARACTERIZACIÓN DE UN JARABE DE ESPIRONOLACTONA AL 0,5% PARA USO PEDIÁTRICO

Provenza, N<sup>1</sup>, Clares, B<sup>2</sup>; Ruiz, A<sup>2</sup>, Halbaut, L<sup>1</sup>; Gutierrez<sup>1</sup>, C; Calpena, A.C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona

<sup>2</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada

## Introducción

Considerar al niño como si fuera un adulto pequeño puede llevar a graves errores de dosificación de fármacos. Son numerosos los principios activos que sólo están comercializados en nuestro país en formas farmacéuticas sólidas (cápsulas o comprimidos) y muchas veces, a dosis más elevadas de las que necesitarían los lactantes y/o niños. La falta de disponibilidad en el mercado farmacéutico de productos adaptados a las necesidades de los niños, y en especial a las del neonato conduce inevitablemente a la elaboración de fórmulas magistrales.

No obstante la variabilidad en el diseño de dichos preparados junto con los escasos estudios de estabilidad de las formas líquidas orales, seleccionadas como alternativa a las formas sólidas comercializadas, conlleva la posibilidad de errores de dosificación.

En nuestro entorno, son pocos los estudios que han valorado la utilización de fórmulas magistrales para el uso en pediatría. Es decir que, el mayor inconveniente para difundir estos fármacos es la falta de investigación no sólo a nivel clínico, por motivos obvios, sino a nivel tecnológico.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización de una de las fórmulas magistrales más prescritas y elaboradas en los principales hospitales y farmacias comunitarias del territorio español, teniendo en cuenta su desarrollo y estudio de estabilidad.

## Materiales y Métodos

### 1. Selección de la fórmula

- Espironolactona 0,5% (Fagron Iberica, S.A.U.)

- Jarabe simple c.s.p. 100 ml (Fagron Iberica, S.A.U)

Se guardaron alícuotas de 20 ml cada una, protegidas de la luz y a las temperaturas de 4, 25 y 40°C.

### 2. Método analítico

La cuantificación del principio activo se realizó mediante:

-Espectroscopía UV: espectrofotómetro UV Amersham Biosciences Modelo Ultrospec 1100, acoplado a un ordenador provisto del

programa UV-Vis 8500 a la longitud de onda de 242 nm.

-Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC): Cromatógrafo Waters 717 plus autosampler, acoplado a un ordenador provisto del programa Millennium<sup>32</sup>, columna atlantis® dC18 5µm 4.6x150 mm, flujo: 0.8ml/min., longitud de onda de 242 nm. Como fase móvil se utilizó una mezcla metanol:agua (63:37).

### 3. Validación de la técnica analítica

La validación de la metodología analítica, en ambos casos, se realizó mediante la preparación y valoración de 6 rectas de calibración, elaboradas en días diferentes (valoración interdía). El solvente empleado fue una mezcla metanol:agua (30:70). Como criterios fundamentales de validación se utilizaron la linealidad, la precisión, la exactitud y los límites de detección y cuantificación (1). El soporte informático para el tratamiento de los datos fue el programa Graph Pad Prism.

### 3. Estudio del pH.

Este estudio se realizó con un pH-metro Crison microPH 200, Model 2000.

### 4. Reología-determinación de la viscosidad

El dispositivo de medida consta de viscosímetro Haake VT500, baño termostático con sistema de recirculación de agua (Haake C25P) y ordenador PC provisto de software HAAKE Rheowin Job Manager v. 3.3. El viscosímetro consta de dos cilindros coaxiales, Haake MV2 o cilindro interior móvil y MV o cilindro exterior fijo.

### 5. Caracterización óptica mediante Multiple Light Scattering (MLS).

El dispositivo utilizado fue el Turbiscan™ Lab.

### 6. Estudio de estabilidad

La cuantificación del principio activo en la fórmula se llevó a cabo a las temperaturas de 4, 25 y 40°C y a los 0, 7, 15, 30 y 60 días en UV y a los 0 y 25 días en HPLC.

El estudio de pH se llevó a cabo de forma paralela a la cuantificación del principio activo.

Tanto el estudio reológico como la caracterización óptica se realizaron a 0 y 45 días, a una temperatura de 25°C.

## Resultados y Discusión

### 1. Validación de la técnica analítica

Ambos métodos resultaron ser lineales, precisos (> 98,15% para UV y > 90.5% para HPLC) y con una exactitud superior a 90.76% y 98.9% para UV y HPLC respectivamente, en el rango de concentraciones de 3.125 µg/ml a 50 µg/ml para UV y de 0.39 µg/ml a 50 µg/ml para HPLC. Los límites de detección fueron de 1,183±0.121 µg/ml para UV y de 0,22±0.26 µg/ml para HPLC y los límites de cuantificación fueron de 3.587±0.367 µg/ml y de 0,68±0.79 µg/ml para UV y HPLC, respectivamente.

### 2. Estudio del pH y análisis del contenido de principio activo.

El análisis espectrofotométrico muestra un contenido de espirolactona, a partir del día 7, superior a la cantidad teórica, manteniéndose esta circunstancia a lo largo de todo el estudio (60 días) (figura 1).

Este hecho coincide con los resultados obtenidos para el pH, mostrando valores alrededor de 5 en el día 0 y aumentando a lo largo del estudio, llegando hasta valores próximos a 6. Este aumento de pH podría ser debido a la presencia de conservantes (2) procedentes del jarabe simple lo que podría provocar la formación de metabolitos de degradación, tales como canrenona, 7α toiespirolactona u otros desconocidos (3).

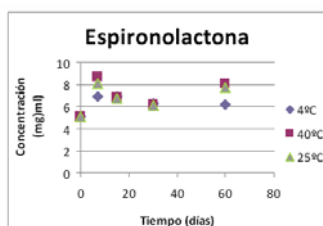


Figura 1. Concentración de espirolactona (UV) a lo largo del tiempo.

Para profundizar más en este aspecto, se realizó un segundo análisis del contenido de principio activo utilizando la técnica de HPLC. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de espirolactona en el jarabe se mantiene estable a lo largo del estudio no observándose variabilidades superiores al 10% (descritas en la bibliografía como aceptables

para preparaciones extemporáneas (4)), independientemente de la temperatura de almacenamiento.

Desde el día 0 y a la misma longitud de onda se observa la aparición de un segundo pico con un tiempo de retención menor al de la espirolactona. Observando los resultados obtenidos en un blanco, este pico se atribuye al excipiente utilizado, independientemente de la temperatura de almacenamiento, no afectando al contenido del principio activo.

### 3. Reología

La fórmula presenta un comportamiento newtoniano. A lo largo del estudio se observan pequeñas diferencias aunque no significativas en cuanto a la adecuación y facilidad de dosificación.

### 4. Caracterización óptica por MLS.

El análisis por MLS refleja (figura 2) fenómenos de sedimentación debido a su forma farmacéutica en suspensión, así como fenómenos de flotación del principio activo en la superficie de la muestra, debido a la baja humectabilidad del principio activo. Para solventar este último fenómeno, se debería tratar de incluir algún humectante, adecuado para uso pediátrico.

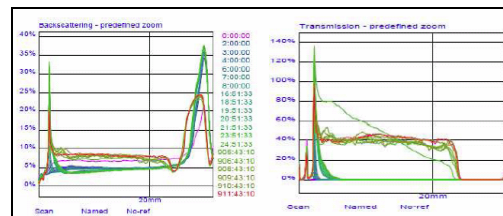


Figura 2. Caracterización óptica mediante MLS (45 días).

## Conclusiones

El jarabe de espirolactona al 0,5% es estable, manteniendo la concentración de espirolactona durante los 25 días de duración del estudio independientemente de la temperatura de almacenamiento.

## Referencias

- (1) Aguirre, O. L., Pérez, C. J. A., & Pujol, F. M. *Validación de métodos analíticos*. Barcelona: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 2001.
- (2) Salgado, C., Rosa, M.L., Duarte, M.A. Almeida, A.J. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science*, 11(3), 68-73. 2005.
- (3) Pramari, Y., & Gupta, V. D. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(6), 551-553. 1991.
- (4) Eley, J. G. *American Journal of Health-System Pharmacy*: Ajhp, 56(9), 926. 1999.

## Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico del Medicamento Individualizado por su colaboración e interés.



## Compounding For Pediatric Patients

Paula Tavares

LEF, Instituto de Formação e Inovação em Saúde

### Objective(s)

Knowledge of the paediatric compounded preparations (PCP), in Portugal. Development and validation of oral pharmaceutical forms, establishing the galenic formula, the preparation procedure and the term of use supported with stability studies.

Availability of the pharmacotherapeutic information for informed hand over and suitable use of the PCP (package information leaflet). **Design & Methods**

Inquiry targeted to Community and Hospital pharmacies, asking about the active substance, dosage, dosage form, excipients, indications for use and posology. Analysis of the requests made to the Pharmaceutical compounding Information Center (CIMPI) from LEF. PCP selection for laboratory study, following the criteria: a) higher frequency of use; b) therapeutic need; c) trouble in the formulation or stability of the compound. Physic-chemical and microbiological stability study for 2 months. Edition of the Portuguese Galenic Formulary (PGF)

### Results and Conclusions

30% of compounded preparations are paediatrics. 15% of the PCP are dermatological, 18% are for cardiovascular diseases and 15% are antiinflammatories. Powder packets represent 10%, capsules 5%, oral liquids 61%, topical liquids 10% and semisolids 14%. The PGF includes 184 paediatric compounded preparations corresponding to 92 active substances. The cardiovascular PCP represents 20%, dermatological 20% anti-inflammatories 16% and gastrointestinal 16%. PCP addressed to the NSC, Endocrine and metabolism and nutrition disorders represent 8% each. 66% of the PPC are oral liquids. Preparations contain suitable excipients for paediatric use and enable a simple preparation in the pharmacy. Package information leaflet is clear and simply organized. Recommendations on the dosage, posology and indication for therapeutic use are given for all PCP.

### Ranitidine, Spironolactone and Furosemide Paediatric Extemporaneous Formulations: Preparation and Stability Study from Spanish Unified Perspective

Beatriz Clares, Nora Provenza<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Adolfinia Ruíz Martínez, Visitación Gallardo Lara, Ana Cristina Calpena Campmany<sup>1</sup>  
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology,  
Faculty of Pharmacy, University of Granada (Spain),  
University of Barcelona<sup>1</sup> (Spain)

**Introduction:** Differences in physiology during the childhood development mean that the pharmacokinetic and pharmacodynamic data of children cannot be predicted from adult data.

Therefore, to guarantee a better administration, dosage and therapeutic adherence, choosing an adequate pharmaceutical form, is very important.

The absence of paediatric presentation leads to Pharmaceutical Compounding (mainly solutions or suspensions in Spain) with a high variability on the design and the stability which may lead to dosing errors.

**Aim:** Development and stability study of paediatric formulations most demanded in Spanish hospital or community pharmacies, such as ranitidine, spironolactone, and furosemide to establish a single formulation criterion.

**Methods:** The compositions (Table 1) of the three formulations are unified.

Active substance (mg/ml)	Excipients
Ranitidine 15	Simple Syrup 50 ml; Purified Water q.s. 100 ml
Spironolactone 5	Simple Syrup q.s. 100ml
Furosemide 2	Sodium methyl p-hydroxibenzoate 0.68 mg, Sodium propyl p-hydroxibenzoate 0.34 mg Sodium Phosphate 12 H <sub>2</sub> O -68.4 mg, Citric acid 1 H <sub>2</sub> O 0.58 mg Simple syrup 0.4 ml, purified water 0.56 ml

**Table 1.** Composition of ranitidine, spironolactone, and furosemide extemporaneous paediatric liquids

The spectrophotometric analytical method was validated. The stability studied encompassed: Multiple Light Scattering (MLS), pH, rheology and concentration at three different temperatures (4, 25, 40°C) during 60 days. The results were statistically analyzed by Anova (p<0.05).

**Results:** Backscattering and Transmission spectra showed homogeneity for ranitidine and furosemide formulations. Sedimentation and flotation were observed for spironolactone syrup. The pH values, rheological behavior (pseudoplastic-non tixotropic) and concentration of ranitidine and furosemide showed no statistically significant differences at different time points regardless of the temperatures. However, concentration of spironolactone increased from the day 7, probably due to degradation metabolites produced at pH>5.