

Estabilidade do ácido fólico em suspensão oral extemporânea

Stability of folic acid in extemporaneous oral suspension

Sandra Santos¹, Alexandra Sá¹, Ana Saião² e Catarina Pecorelli²

¹ Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, Rua do Telhal aos Olivais, 8-8A,
1900-693 Lisboa, Portugal.

² Departamento de Ciências de Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376,
1749-026 Lisboa, Portugal.

Resumo

Apesar do ácido fólico (AF) ser utilizado em pediatria na prevenção e tratamento de deficiências desta vitamina, não existe actualmente disponível uma forma farmacêutica adequada a doentes pediátricos, o que requer o desenvolvimento de uma preparação líquida extemporânea. A utilização segura destas preparações deve ser suportada por documentação adequada sobre estabilidade física e química. O objectivo do presente trabalho foi investigar a estabilidade do AF numa suspensão oral extemporânea 50 g/ml, preparada a partir de comprimidos disponíveis comercialmente (5 mg). A suspensão de AF foi conservada em recipientes de vidro à temperatura de 2-8 °C e sob protecção da luz. Cinco amostras independentes foram analisadas no tempo 0 e após 1, 3, 5 e 7 dias. O teor em AF foi determinado através de um método de HPLC em fase reversa, com adequada linearidade, precisão, exactidão e selectividade. A concentração de AF foi superior a 95% em todos os tempos de amostragem e a aparência física, cor e odor da suspensão não sofreram alteração durante o período do estudo. O AF revelou ser estável em suspensão aquosa pelo menos durante 14 dias a 2-8 °C e ao abrigo da luz, o que poderá permitir a sua utilização em doentes pediátricos

Palavras-chave: Pediatria, formulações extemporâneas, ácido fólico, estabilidade.

Abstract

Although folic acid (FA) has been used in paediatrics to prevent or treat deficiencies of this vitamin, a suitable dosage form is not currently available for paediatric patients, which means that an extemporaneous liquid dosage form must be developed. The use of these preparations must be supported by convenient documentation of physical and chemical stability. The aim of this study was to investigate the stability of FA in a 50 g/mL extemporaneous oral suspension, prepared from commercially available tablets (5 mg). The folic acid suspension was stored in glass containers at 2-8 °C and under light protection. Five independent samples were analysed at time 0 and after 1, 3, 5, 7 and 14 days. Folic acid concentrations were quantified by a reversed-phase HPLC method, with acceptable linearity, precision, accuracy and selectivity. The concentration of folic acid was above 95% in all the sampling times and the suspension, physical appearance, colour and odour did not change during the study period. Folic acid was stable in aqueous suspension for at least 14 days under refrigeration (2-8 °C) and light protection, which could permit its use in paediatric patients.

Key-words: Paediatrics, extemporaneous formulations, folic acid, stability.

Introdução

A maioria dos medicamentos de uso humano disponíveis no mercado não apresenta uma aprovação específica para a sua utilização em pediatria, o que poderia representar uma verdadeira limitação ao acesso a regimes terapêuticos totalmente otimizados. No entanto, na realidade verifica-se que uma elevada percentagem dos medicamentos utilizados em ambiente hospitalar pediátrico corresponde a medicamentos não autorizados (em relação à idade, via de administração ou indicação terapêutica) ou sem indicação clínica específica (regime *off-label*) para doentes pediátricos^[1]. De facto, num estudo realizado em 5 hospitais pediátricos Europeus verificou-se que mais de metade dos medicamentos utilizados (63%), correspondiam a medicamentos não autorizados e/ou em regime *off-label* para doentes pediátricos^[2].

Custos elevados, imposições legais adicionais e retorno financeiro limitado, dado o reduzido tamanho do mercado pediátrico para a maioria das indicações terapêuticas, constituem impedimentos ao desenvolvimento e comercialização de formulações farmacêuticas pediátricas. Assim, a menos que determinada patologia ocorra exclusiva ou frequentemente na população pediátrica, a indústria farmacêutica é relutante em financiar a investigação e desenvolvimento de formulações pediátricas^[3].

A administração de uma dose pediátrica precisa, eficaz e segura exige uma avaliação pormenorizada das diferenças em termos farmacocinéticos e farmacodinâmicos entre doentes adultos e pediátricos, o que nem sempre pode ser traduzido por um simples ajuste posológico por peso corporal ou área de superfície corporal. Por outro lado, é necessário considerar questões práticas relacionadas com a adesão à terapêutica. O sabor, a textura e a facilidade de administração são factores de enorme importância em contexto pediátrico.

Quando não existe disponível, para uma determinada substância activa, um medicamento para uso pediátrico, as alternativas possíveis incluem: a) utilização de uma substância activa semelhante, mas que eventualmente poderá apresentar menor eficácia e/ou maior toxicidade; b) ajuste posológico do medicamento disponível para a população adulta, mas sem alteração da forma farmacêutica; c) preparação de uma formulação extemporânea a partir do medicamento para uso em doentes adultos^[4]. O principal obstáculo à segunda opção corresponde à reduzida disponibilidade de formas de dosagem líquidas. Em geral, crianças com idade inferior a 7 anos ou em situações de disfagia ou com alterações mentais, apresentam dificuldade na ingestão de formas de dosagem sólidas. Por outro lado, a administração de doses pediátricas de acordo com o peso corporal ou a

Introduction

The majority of commercially available human medicines has not presented any special licence for paediatric use, which could represent a real limitation in the access to a fully optimized therapeutic regimen. Nevertheless, a high percentage of drugs used in a paediatric hospital environment are either not licensed for use in children (in relation to age, administration route or therapeutic indication) or are prescribed outside the terms of their product licence (off label prescribing).^[1] In fact, a study performed in five European paediatric hospitals observed that over half of the patients (63%) received an unlicensed or off label drug prescription.^[2]

High costs, additional regulatory requirements and limited financial returns, consequence of the small size of the paediatric market for many therapeutic uses, are impediments to the development and marketing of paediatric formulations. Thus, unless a disease occurs exclusively or frequently in the paediatric population, the pharmaceutical industry is reluctant to support research and development of paediatric dosage forms.^[3]

A careful evaluation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between adult and paediatric patients is required for the administration of an accurate, effective and safe paediatric dose, which is not always obtained by a simple dose adjustment for the body weight or body surface area. Aside from pharmacologic issues, it is important to consider practical questions of therapeutic compliance. Taste, texture and ease of administration are also important factors in the paediatric context.

When a suitable paediatric formulation is not available for a particular drug, the possible options have included: a) use of a similar drug, which could potentially be less effective and/or more toxic; b) dose adjustment of the available adult medicine, but with no alteration of its pharmaceutical form; c) preparation of an extemporaneous formulation from the adult dosage form.^[4] The reduced availability of liquid dosage forms represents the main obstacle to the second option. Most children under the age of seven and older children with dysphasia or an altered mental status, have difficulty swallowing solid dosage forms. Further, a liquid form is required for the oral administration of paediatric doses based on body weight or weight surface area.^[3]

As in other European countries, the use of extemporaneous products in Portuguese paediatric hospitals is considered to be significant. In a 2003 study, which was performed to quantify the types of extemporaneous preparations that are prepared in a pharmacy at a British paediatric hospital, there was an observation that most of the preparations were for the treatment of metabolic diseases (30%), central nervous

área de superfície corporal, exige a existência de uma forma líquida^[3].

A utilização de produtos extemporâneos em hospitais pediátricos em Portugal é, à semelhança de outros países europeus, considerada significativa. Num estudo realizado em 2003, com o objectivo de avaliar o tipo de produtos extemporâneos preparados num hospital pediátrico britânico, observou-se que a maioria se destinava ao tratamento de alterações metabólicas (30%), de alterações do sistema nervoso central (19%) ou de infecções virais (11%). Por outro lado, a maioria das preparações extemporâneas correspondeu a formulações líquidas orais, preparadas a partir de matérias-primas, comprimidos, cápsulas ou injectáveis: soluções (30%), suspensões (15%) e papéis medicamentosos para reconstituição (13%)^[5].

Um processo simples de se obter uma formulação extemporânea oral, consiste na pulverização de comprimidos e eventual diluição com um excipiente inerte, com obtenção dos designados papéis medicamentosos. A sua utilização apresenta algumas limitações, nomeadamente, elevado consumo de tempo na sua preparação, possibilidade de ocorrerem perdas no momento da administração e necessidade de mistura prévia com alimentos para facilitar a sua ingestão. Preferencialmente, o conteúdo dos comprimidos ou cápsulas deve ser dissolvido ou disperso num veículo líquido adequado, originando soluções ou suspensões orais. Podem ser adicionados vários excipientes para auxiliar a solubilização da substância activa (e.g. derivados da celulose), para favorecer a estabilidade química (anti-oxidantes) e microbiológica (conservantes) ou, simplesmente, para melhorar o sabor e/ou odor (xaropes e aromatizantes).

Sempre que não exista uma forma líquida adequada à administração pediátrica, é frequente recorrer-se a uma formulação oral extemporânea, cuja estabilidade, biodisponibilidade, eficácia e segurança tenha sido idealmente avaliada. No entanto, dada a reduzida prioridade no financiamento deste tipo de estudos por entidades governamentais, indústria farmacêutica ou associações profissionais, os dados disponíveis são considerados claramente insuficientes^[3,4].

Num estudo recente realizado em 21 hospitais pediátricos de 16 países Europeus, observou-se, para além da limitada informação sobre formulações extemporâneas, uma reduzida harmonização nas concentrações e nos métodos utilizados para a sua preparação nos diferentes países avaliados. Por exemplo, na Inglaterra e na Suécia predominam as preparações líquidas, na França e Espanha as cápsulas e na Finlândia e Itália, os pós^[6].

Numa primeira fase de desenvolvimento de uma preparação extemporânea, é essencial verificar a estabilidade da substância activa desde o momento da sua preparação até à respectiva administração.^[3] Os

system disorders (19%) and antiviral medicines (11%). On the other hand, most of the extemporaneous formulations were oral liquid formulations prepared from raw materials, tablets, capsules or injections: solutions (30%), suspensions (15%) and powder for reconstitution (13%).^[5]

The preparation of drug powder packets after tablet pulverization and eventual dilution with an inert excipient is one of the simplest preparation methods for an oral extemporaneous formulation. However, the use of drug powder packets has several limitations: the preparation is extremely time-consuming and it is difficult to administer without loss or the previous requirement of mixture with food, in order to improve their oral ingestion. Preferentially, the contents of tablets and capsules are dissolved or dispersed in an appropriate liquid vehicle to prepare extemporaneous oral solutions or suspensions. Several excipients could be used to aid drug solubilization (cellulose derivatives), increase chemical (antioxidants) and microbiological stability (preservatives) or merely improve palatability (syrups and flavours).

Whenever a liquid formulation for paediatric administration is not available, it is common to resort to an extemporaneous oral preparation, whose stability, bioavailability, efficiency and safety have been ideally evaluated. However, the available data of such studies are limited due to the extremely low priority they are given by government funding, the pharmaceutical industry or professional associations.^[3,4]

A recent study, performed in 21 pediatric hospitals from 16 European countries, has confirmed that the available information on extemporaneous formulations is awfully limited and there is little harmonization considering the strength and preparation method of extemporaneous formulations used in different countries. For example, liquid preparations predominate in England and Sweden, while in France and Spain it is capsules, and Finland and Italy use powders.^[6]

In the earliest step of the development of an extemporaneous preparation, the evidence of drug stability since its preparation until its administration is crucial.^[3] Stability studies should be performed for the desired drug concentration and in real storage conditions (storage temperature, duration and type of container). The physical stability is assessed from changes in appearance, colour or odour, while the chemical stability is determined using an adequate analytical method for the drug quantification.^[3,4]

Microbiological stability studies should be conducted in extemporaneous oral formulations containing no or insufficient preservatives and be stored at room temperature over an extended period.^[4]

In this context, the main aim of the present study was to evaluate the physical and chemical stability of an

estudos de estabilidade devem ser realizados para a concentração desejada de substância activa e nas condições reais de armazenamento (tipo de recipiente, duração e temperatura de conservação). A estabilidade física é avaliada por alterações da aparência física, cor ou odor, enquanto que a estabilidade química é assegurada através de um método analítico adequado à quantificação da substância activa^[3,4]. Em formulações orais extemporâneas recomenda-se a realização de estudos microbiológicos, no caso da ausência ou insuficiência de conservantes e se se destinam a ser armazenadas à temperatura ambiente por um longo período de tempo^[4].

Neste sentido, o principal objectivo do presente estudo foi a avaliação da estabilidade física e química de uma suspensão oral extemporânea de ácido fólico (AF), para o qual não existe disponível comercialmente uma formulação adequada à administração pediátrica. Apesar das recomendações do uso de AF (0,4 mg/dia) no período periconcepcional estarem principalmente focadas na prevenção de defeitos no tubo neural^[7], vários estudos sugerem que a sua utilização pode reduzir o risco de outras situações patológicas como alterações cardíacas congénitas^[8,9], anomalias do tracto urinário^[9], fissuras orofaciais^[8,10], alterações do limbo^[11] ou estenose pilórica^[8]. Em pediatria, e em especial em neonatologia, o AF utiliza-se no tratamento de deficiências desta vitamina, que podem ocorrer em diversas patologias ou em alguns estados fisiológicos^[12,13].

Materiais e Métodos

Utilizou-se um padrão de AF USP (USP folic acid RS, 100%) e comprimidos de AF disponíveis comercialmente (Folicil 5 mg, Bial). O metanol utilizado foi de grau HPLC (Merck) e os restantes reagentes e solventes de grau analítico (Merck e Sigma-Aldrich).

Equipamento e condições cromatográficas

Foi utilizado um sistema de HPLC (Agilent 110 Series Hewlett Packard) com detector UV-VIS seleccionado a 254 nm. A separação cromatográfica ocorreu em fase reversa, numa coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm I.D. e diâmetro médio de partícula de 5 m, Agilent). Após estudos preliminares, a fase móvel apresentou a seguinte composição: 35,1 g de perclorato de sódio; 1,40 g de fosfato de potássio monobásico; 9,5 ml de hidróxido de potássio 1 N, 60 ml de metanol e água necessária para perfazer o volume para 1 l. Após ajuste do pH com hidróxido de potássio 1 N para 7,2, o eluente de HPLC foi filtrado através de membranas de 0,22 m e desgaseificado por sonicação. A velocidade de fluxo da fase móvel, em condições isocráticas, foi de 1,8 ml/min. Todas as

extemporâneas oral suspension of folic acid (FA), due to the lack of commercially available formulations of this drug for a suitable paediatric administration. Although recommendations for FA intake (0,4 mg/day) in the periconceptual period have mainly focused on neural tube defects^[7], several studies suggest that the use of this vitamin can reduce the risk of other conditions such as congenital heart defects^[8,9], urinary tract anomalies^[9], orofacial clefts^[8,10], limb defects^[11] and pyloric stenosis^[8]. In paediatrics, particularly in neonatology, FA is used in the treatment of this vitamin's deficiencies, which could occur in several pathological and physiological states.^[12,13]

Material and Methods

An USP FA standard (USP folic acid RS, 100%) and commercially available FA tablets were used (Folicil 5 mg, Bial). Methanol was of HPLC grade (Merck), while all other reagents and chemicals were of analytical grade (Merck and Sigma-Aldrich).

Apparatus and chromatographic conditions

The HPLC system used consisted of an Agilent 1100 Series Hewlett Packard with a UV-VIS detector operated at 254 nm. The reversed-phase chromatographic separation was carried out on a stainless-steel ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (250 mm x 4.6 mm I.D.) (mean particle size 5 m, Agilent). After preliminary studies, the mobile phase presented the following composition: 35.1 g of sodium perchlorate and 1.40 g of monobasic potassium phosphate, 9.5 mL of 1N potassium hydroxide, 60 mL of methanol and water to dilute the volume to 1 L. After adjustment with 1N potassium hydroxide to a pH of 7.2 the HPLC eluent was filtered through 0.22 m membrane and was degassed by sonication. The mobile phase was delivered isocratically at a flow rate of 1.8 mL/min. All samples were filtered through 0.22 m membrane filters before HPLC analysis and the injection volume was 25 l.

Optimization and validation of the HPLC method

The available method in the USPXXVIII^[14] for FA tablets was optimized and validated, in order to allow the drug quantification in an aqueous suspension. The final concentration of the aqueous suspension samples was taken into account in the validation method, i.e., the 100% standard (S_{100}) presents a 0.040 mg/mL concentration.

The different standard solutions were prepared by appropriate dilution of the 0.1 mg/mL initial stock solution of folic acid in mobile phase.

The linearity of the method was tested in six standard solutions, prepared in triplicate: 0.016 mg/mL (S_{40}); 0.032 mg/mL (S_{80}); 0.036 mg/mL (S_{90}); 0.040 mg/mL

amostras analisadas foram previamente filtradas através de membranas de 0,22 µm, antes de serem analisadas por HPLC, tendo sido utilizado um volume de injeção de 25 µL.

Optimização e validação do método de HPLC

O método de HPLC disponível na USPXXVIII^[14] para comprimidos de AF foi otimizado e validado de modo a permitir a quantificação desta substância activa numa suspensão aquosa. Na validação do método analítico, foi tida em consideração a concentração final de AF nas amostras de suspensão aquosa, ou seja, o padrão correspondente a 100% (P_{100}) apresenta uma concentração de 0,040 mg/ml.

As diferentes soluções padrão foram preparadas por diluição apropriada de uma solução-mãe de AF em fase móvel com uma concentração de 0,1 mg/ml.

A linearidade do método foi avaliada em seis soluções padrão, preparadas em triplicado: 0,016 mg/ml (P_{40}); 0,032 mg/ml (P_{80}); 0,036 mg/ml (P_{90}); 0,040 mg/ml (P_{100}); 0,044 mg/ml (P_{110}) e 0,048 mg/ml (P_{120}). A curva de calibração das áreas do pico de AF em função das respectivas concentrações foi submetida a uma análise de regressão linear. A recta de regressão linear obtida foi utilizada para o estudo subsequente dos outros parâmetros de validação.

A precisão do método foi testada numa solução padrão de concentração 0,040 mg/ml (P_{100}). A repetibilidade instrumental foi obtida através de seis análises consecutivas da mesma solução padrão, enquanto que a repetibilidade do método foi verificada após injeção de 6 soluções padrão preparadas individualmente no mesmo dia e por um único operador. Para se determinar a precisão intermédia, foram preparadas seis soluções padrão individuais num dia diferente e por um segundo operador.

A exactidão do método foi avaliada em três níveis diferentes de concentração e em triplicado: 0,016 mg/ml (P_{40}), 0,040 mg/ml (P_{100}) e 0,048 mg/ml (P_{120}).

De forma a detectar a possível interferência dos excipientes constituintes dos comprimidos de AF utilizados neste estudo no método de HPLC, a selectividade foi avaliada em soluções de AF contendo igualmente os componentes da matriz. Assim, procedeu-se previamente à preparação de uma solução de AF 0,016 mg/ml a partir de comprimidos pulverizados. Esta solução foi posteriormente fortificada com volumes crescentes da solução-mãe 0,1 mg/ml, de modo a obterem-se soluções de AF com concentrações de 0,032 mg/ml, 0,040 mg/ml (S_{100}) e 0,048 mg/ml.

Estabilidade física e química da suspensão oral de AF

Após pulverização de 20 comprimidos de AF, utilizou-se uma quantidade de pó rigorosamente pesada e

(S_{100}); 0,044 mg/mL (S_{110}) and 0,048 mg/mL (S_{120}). A calibration curve of folic acid peak areas against the corresponding drug concentrations was subject to a linear regression analysis. The linear regression equation obtained was used for the subsequent study of the validation parameters.

The 0,040 mg/mL FA standard solution (S_{100}) was used to determine the method precision. The instrumental repeatability was obtained by analysing the same standard solution six consecutive times, while the method repeatability was assessed after injection of six standard solutions individually prepared in the same day and by one operator. To achieve the intermediate precision, the six individual standard solutions were prepared on another day and by a second operator.

The accuracy of the method was obtained at three different concentration levels and in triplicate: 0,016 mg/mL (S_{40}), 0,040 mg/mL (S_{100}) and 0,048 mg/mL (S_{120}).

In order to evaluate the possible interference of the tablets' excipients in the HPLC method, the selectivity was tested in FA solutions containing also the matrix components. Thus, a 0,016 mg/mL FA solution was previously prepared from pulverized tablets. This solution was further spiked with crescent volumes of the 0,1 mg/mL initial stock solution, resulting in the 0,032 mg/mL, 0,040 mg/mL and 0,048 mg/mL FA solutions.

Physical and chemical stability of the FA oral suspension

After pulverization of 20 FA tablets, a portion accurately weighed and equivalent to 50 mg of the drug was used to prepare 1000 mL of an aqueous suspension with a concentration of 50 g/mL. Aliquots of 20 mL of the aqueous suspension were transferred to 25 mL volumetric flasks and were stored at temperatures between 2 to 8 °C. To prevent the FA photodegradation when exposed to ultraviolet radiation^[15,16], the samples were maintained under light protection, by wrapping the containers with aluminium foil.

The physical and chemical stability of the samples were assessed at time 0 (preparation day) and after 1, 3, 5, 7 and 14 days. At each sampling time, the physical appearance, colour and odour of the AF suspension were observed in 5 volumetric flasks and then their volume was diluted with a mobile phase until 25 mL. After 10 min of sonication, the samples were analysed by HPLC and conveniently discarded after analysis.

Results

Optimization and validation of the HPLC method

The optimization of the HPLC method available in the USPXXVII^[14] for FA tablets quantification drastically reduced the retention time of drug peak from

equivalente a 50 mg de substância activa para preparar 1000 ml de uma suspensão oral com uma concentração de 50 g/ml. Transferiram-se alíquotas de 20 ml da suspensão aquosa para balões volumétricos de 25 ml, tendo sido posteriormente conservados a temperaturas entre 2 a 8° C. Para prevenir a fotodegradação do AF quando exposto a radiações ultravioleta^[15,16], as amostras foram mantidas sob protecção da luz, por revestimento dos recipientes com folha de alumínio.

A estabilidade física e química das amostras foram avaliadas no tempo 0 (dia da preparação) e após 1, 3, 5, 7 e 14 dias. A cada tempo de amostragem, depois de se observar a aparência física, cor e odor da suspensão de AF em cinco balões volumétricos, completou-se o seu volume para 25 ml com fase móvel. Após 10 min de sonicação, as amostras foram analisadas por HPLC e devidamente descartadas após análise.

Resultados

Optimização e validação do método de HPLC

A optimização do método de HPLC disponível na USPXXVII^[14] para a quantificação de comprimidos de AF reduziu drasticamente o tempo de retenção da substância activa, de aproximadamente 35 min para 6,5 min.

A equação de regressão linear verificada para as áreas do pico de AF (y) em função da sua concentração (x), no intervalo de concentrações de 0,016-0,048 mg/ml, foi a seguinte $y = 22925x - 13,525$, com um coeficiente de determinação de (r^2) 0,998 (n=3).

Os parâmetros da precisão do método (repetibilidade instrumental, repetibilidade do método e precisão intermédia) obtidos por análise da solução padrão de AF 0,040 mg/ml (n=6), expressos nos respectivos coeficientes de variação, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Precisão do método de HPLC para a quantificação do AF, expressa em coeficiente de variação (CV) (n=6).

Table 1 - HPLC method precision for FA quantification, expressed as relative standard deviation (RSD) (n=6).

Parâmetro da precisão <i>Precision parameter</i>	CV (%) <i>RSD (%)</i>
Repetibilidade instrumental <i>Instrumental repeatability</i>	1.70
Repetibilidade do método <i>Method repeatability</i>	1.53
Precisão intermédia <i>Intermediate precision</i>	1.84

approximately 35 min to 6.5 min.

The obtained linear regression equation for FA peak areas versus drug concentration in the concentration range of 0.016-0.048 mg/mL was the following $y = 22925x - 13.525$, with a determination coefficient (r^2) of 0.998 (n=3).

The precision parameters (instrumental repeatability, method repeatability and intermediate precision) attained by analysis of 0.040 mg/mL FA standard solution (n=6), expressed as relative standard deviations, are presented in Table 1.

Para avaliar a exactidão do método de HPLC, foram calculadas as percentagens médias de recuperação para três níveis de concentração de AF (0,016; 0,040 e 0,048 mg/ml), por comparação com os respectivos valores teóricos (Tabela 2).

To assess the accuracy of the HPLC method, the mean recovery percentages for the three levels of folic acid concentration (0.032; 0.040 and 0.048 mg/mL) were calculated by comparing to the corresponding theoretical values (Table 2).

Tabela 2 - Precisão do método de HPLC para a quantificação do AF, expressa na percentagem media de recuperação (\pm desvio padrão), para três níveis de concentração (n=3).

Table 2 - HPLC method accuracy for FA quantification, expressed as mean recovery percentage (\pm standard deviation), for three concentration levels (n=3).

Concentração AF (mg/ml) FA concentration (mg/mL)	Recuperação (%) Recovery (%)
0,016 (P40)	97,31 \pm 4,50
0,040 (P100)	99,66 \pm 3,08
0,048 (P140)	101,03 \pm 2,73

Foi construída uma curva de calibração (áreas do pico do AF *versus* respectivas concentrações) a partir dos resultados das soluções utilizadas na avaliação do parâmetro de selectividade, ou seja, uma solução não fortificada 0,016 mg/ml e três soluções fortificadas (0,032; 0,040 e 0,048 mg/ml). O coeficiente de determinação (r^2) associado à equação de regressão linear obtida ($y = 25820x - 58,485$) foi de 0,991 (n=3).

A calibration curve (FA peak areas versus drug concentrations) was constructed with the results from the solutions used in the selectivity parameter evaluation, i.e., with a 0.016 mg/mL unspiked solution and with three spiked solutions (0.032; 0.040 and 0.048 mg/mL). The obtained linear regression equation ($y = 25820x - 58.485$) was associated to a determination coefficient (r^2) of 0.991 (n=3).

Estabilidade física e química da suspensão oral de AF

Os resultados da avaliação da estabilidade física e química da suspensão oral extemporânea de AF, mediante monitorização da aparência física, cor e odor, assim como do conteúdo em AF, respectivamente, nos tempos de amostragem previamente definidos (0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias), encontram-se sumariados na Tabela 3.

Physical and chemical stability of the oral suspension

The results of the physical and chemical stability of the FA extemporaneous oral suspension, by monitorization of physical appearance, colour and odour, as well FA content, respectively, in the sampling times previously defined (0, 1, 3, 5, 7 e 14 days) are summarized in Table 3.

Tabela 3 - Estabilidade física e química da suspensão oral extemporânea de AF (n=5).

Table 3 - Physical and chemical stability of the FA extemporaneous oral suspension (n=5).

Tempo (dias) Time (days)	Aparência física, cor e odor Physical appearance, colour and odour	Concentração (%)* Concentration (%)*
t ₀	Inalterada Unchanged	98,99 \pm 2,33
t ₁	Inalterada Unchanged	98,15 \pm 4,01
t ₃	Inalterada Unchanged	95,73 \pm 3,30
t ₅	Inalterada Unchanged	97,00 \pm 3,47
t ₇	Inalterada Unchanged	99,76 \pm 2,55
t ₁₄	Inalterada Unchanged	99,82 \pm 3,05

* Cada valor representa a média \pm desvio padrão.

* Each value represents the mean \pm standard deviation.

Discussão

No processo de otimização do método de HPLC disponível na USPXXVII^[14] para comprimidos de AF, observou-se uma redução do tempo de retenção da substância activa com o aumento do fluxo do eluente e da percentagem de metanol da fase móvel. O eluente final foi seleccionado em função da óptima resolução e forma do pico do AF, associadas a um reduzido tempo de retenção (6,5 min). Além disso, a substituição do solvente aquoso aconselhado para a preparação das amostras, por fase móvel erradicou a interferência significativa dos picos dos constituintes do solvente (hidróxido de amónio e perclorato de sódio) na quantificação do AF.

O elevado coeficiente de determinação ($r^2 = 0,998$) associado à curva da calibração do AF demonstrou uma excelente linearidade na gama de concentrações estudadas (0,016-0,048 mg/ml). A linearidade do método foi igualmente confirmada por análise estatística dos dados de regressão linear, por aplicação do teste ANOVA ($p=0,05$).

Os coeficientes de variação obtidos para todos os parâmetros de precisão estudados (repetibilidade instrumental, repetibilidade do método e precisão intermédia) foram inferiores a 2%, o que demonstrou que o método de HPLC é preciso.

As elevadas percentagens de recuperação de AF nos três níveis de concentração avaliados, permitiu afirmar que o método apresenta uma exactidão aceitável, apesar de se ter observado um valor ligeiramente inferior (97,31%) para a concentração de 0,016 mg/ml. Como pode ser observado na Figura 1, a presença dos excipientes constituintes dos comprimidos de AF provocou uma interferência mínima na técnica cromatográfica, o que provou a selectividade do método. Esta evidência foi posteriormente confirmada pelo valor consideravelmente elevado do coeficiente de determinação ($r^2=0,091$) da curva de calibração, obtida com os resultados das soluções utilizadas na avaliação da selectividade do método, e por aplicação de um teste de análise de variância (ANOVA, com $p=0,05$).

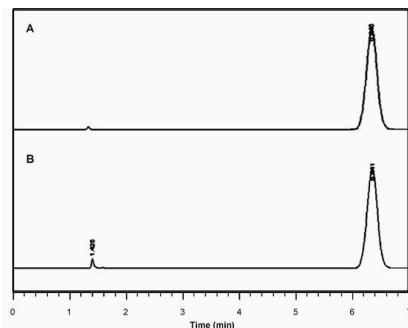


Figura 1 - Cromatogramas-tipo de uma solução padrão de AF (A) e de uma solução de AF contendo os excipientes dos comprimidos utilizados na preparação da suspensão extemporânea (B).

Figure 1 - Typical chromatograms of an FA standard solution (A) and an FA solution containing the excipients of the tablets used in the extemporaneous suspension preparation (B).

Discussion

During the optimization of the HPLC method available in the USPXXVII^[14] for folic acid tablets, a reduction in the drug retention time was observed by increasing the flow rate and methanol content of the mobile phase. The final eluent was selected in terms of optimum resolution and FA shape peak, associated to a reduced retention time (6.5 min). Moreover, the substitution of the advised aqueous solvent for sample preparation by the mobile phase eradicated the significant interference of the solvent component (ammonium hydroxide and sodium perchlorate) peaks in the FA quantification.

The high determination coefficient ($r^2 = 0.998$) associated to the FA calibration curve proved an excellent method linearity in the studied concentration range (0.016-0.048 mg/mL). The method linearity was also confirmed by a statistical analysis of the regression data (application of a ANOVA test with $p=0.05$).

The relative standard deviation values obtained for all the studied precision parameters (instrumental repeatability, method repeatability and intermediate precision) were below 2%, which demonstrated that the method is precise.

The high FA recovery percentages over the three evaluated concentrations allowed us to affirm that the method has acceptable accuracy, although a slightly small value (97,31%) was found at 0.016 mg/mL concentration.

As it can be seen in Figure 1, minimal interference of the tablets' components was obtained in the present chromatographic technique, which could prove the selectivity of the method. This evidence was further confirmed by the relatively high determination coefficient ($r^2=0.091$) of the calibration curve plotted with the results from the solutions used in the method selectivity evaluation and by the application of an analysis of variance test (ANOVA, with $p=0.05$).

A aparência física, cor e odor da suspensão oral extemporânea de AF não sofreram alterações ao longo de toda a duração do estudo (14 dias), o que revela uma estabilidade física aceitável.

Durante o estudo da estabilidade química da suspensão oral de AF foram observadas pequenas flutuações no conteúdo da substância activa, expresso em percentagem. Contudo, a análise de variância (ANOVA, com $p=0,05$) revelou não existir diferença significativa entre as percentagens de AF obtidas nos diferentes tempos de amostragem ($p>0,05$).

Nos cromatogramas das amostras sujeitas aos diferentes tempos de armazenamento, não se detectou o aparecimento de qualquer novo pico que pudesse ser atribuído a um eventual produto de degradação do AF. Por outro lado, as percentagens de substância activa ao longo de todo o ensaio (14 dias) foram, de acordo com o valor teórico, superiores a 95%. Uma vez que para que uma determinada preparação extemporânea seja considerada quimicamente estável, a quantidade de substância activa deve manter-se igual ou superior a 90% durante o período de armazenamento^[3], pode afirmar-se que a suspensão aquosa de AF é estável durante 14 dias, quando conservada nas condições do presente estudo.

Conclusões

De acordo com os parâmetros de validação, o presente método de HPLC revelou ser linear, preciso, exacto e selectivo na quantificação de AF numa suspensão aquosa, na presença dos excipientes dos comprimidos utilizados na sua preparação.

A suspensão oral extemporânea 50 g/ml de AF, preparada a partir de comprimidos pulverizados, demonstrou ser estável física e quimicamente, pelo menos durante 14 dias, quando conservada em recipientes de vidro a uma temperatura entre 2 e 8 °C e ao abrigo da luz. No entanto, a utilização segura deste tipo de preparações extemporâneas em doentes pediátricos, requer a avaliação da sua estabilidade microbiológica. Apesar da avaliação da estabilidade microbiológica de uma formulação oral extemporânea ser particularmente exigida quando se destina a ser conservada à temperatura ambiente por um longo período de tempo^[4], não pode ser descurado o facto da suspensão oral de AF ser desprovida de qualquer conservante e apresentar natureza aquosa, o que potencialmente favorece o desenvolvimento microbiano.

O desenvolvimento de formulações pediátricas quer de substâncias activas já comercializadas, quer de novas substâncias activas, deve continuar a constituir um desafio. No entanto, enquanto este propósito não for claramente assumido pelas entidades competentes, é prioritária a investigação e a avaliação de formulações

The physical appearance, colour and odour of the FA extemporaneous oral suspension were unchanged throughout the entire study period (14 days), which revealed an acceptable physical stability.

During the chemical stability study of the FA suspension, slight differences in the active substance content (%) were observed. However, the analysis of variance performed (ANOVA, with $p=0,05$) revealed that there were no significant differences between the percentages of FA obtained at different sampling times ($p>0,05$).

The chromatograms of samples analysed at the different storage times, revealed no other peak that could be attributed to a possible FA degradation compound. On the other hand, the percentages of active substance throughout the entire study period (14 days), according to the theoretical value, were higher than 95%. Since an extemporaneous formulation is considered chemically stable when the active substance content is equal or higher than 90% during the storage period^[3], we can conclude that the aqueous suspension of FA is stable during 14 days, when kept at these study conditions.

Conclusions

According to the validation parameters, the present HPLC method proved to be linear, precise, accurate and selective for FA quantification in an aqueous suspension, in the presence of the tablets' excipients used for its preparation.

The 50 g/mL FA extemporaneous oral suspension, prepared from pulverized tablets, was physically and chemically stable, at least during 14 days, when stored in glass containers at temperatures between 2 and 8 °C and under light protection. However, an evaluation of the microbiologic stability is critical for the safe use of this kind of extemporaneous preparations in paediatric patients. Although the microbiologic stability assessment is particularly required for an extemporaneous oral formulation to be stored at room temperature over an extended period^[4], we have to take into account that this FA oral suspension contains no preservatives and presents an aqueous nature, which potentially promote microbiological growth.

The development of paediatric drug formulations for both currently marketed and new drugs should continue to be a challenge. However, until this purpose is not clearly assumed by the competent authorities, the research and formulation of extemporaneous formulations should be a high priority, in order to guarantee the administration of efficient and safe doses to paediatric patients.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Carla Monteiro for