

“DISEÑO Y FORMULACIÓN DE POTENCIALES FORMAS FARMACÉUTICAS DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS ÚTILES FRENTE A MICROORGANISMOS RESISTENTES, CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE ASOCIACIÓN POLIMÉRICA ENTRE EL ANTIBIÓTICO AMPICILINA TRIHIDRATADA Y EL SISTEMA POLIMÉRICO EUDRAGIT® E-100”

PAMELA ÁGREDO SANÍN

ANGÉLICA MARÍA FLÓREZ ROJAS

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

SANTIAGO DE CALI

2013

“DISEÑO Y FORMULACIÓN DE POTENCIALES FORMAS FARMACÉUTICAS DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÁMICOS ÚTILES FRENTE A MICROORGANISMOS RESISTENTES”

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE ASOCIACIÓN POLIMÉRICA ENTRE EL ANTIBIÓTICO AMPICILINA TRIHIDRATADA Y EL SISTEMA POLIMÉRICO EUDRAGIT® E-100”

PAMELA ÁGREDO SANÍN

ANGÉLICA MARÍA FLÓREZ ROJAS

Proyecto de Grado

Asesor: Constain Salamanca Mejía Ph.D.

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

SANTIAGO DE CALI

2013

TABLA DE CONTENIDO

Índice de tablas	
Índice de figuras	
1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Objetivos	3
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
4. Introducción	4
5. Descripción del Trabajo	6
Pregunta de Investigación y Estado del arte.....	6
6. Marco Teórico	7
Antecedentes	7
Aspectos Generales de la Ampicilina	7
Alternativas de solución frente a la resistencia bacteriana.....	8
Sistemas poliméricos como matrices farmacéuticas.....	9
Estudios de Solubilidad	13
Aporte Intelectual del Investigador	14
Impacto Ambiental.....	15
7. Metodología	16
Materiales.....	16
Obtención del sistema polimérico cloruro de Eudragit E-100 modificado.....	16
purificación	17
Diálisis de la solución de cloruro del copolímerodeDimetilaminoetil Metacrilato (cloruro de Eudragit® E100)	17
Liofilización	18
Caracterización estructural del material polimérico	18
Caracterización general de la morfología externa del polímero	19

Obtención de los parámetros de validación para la determinación de ampicilina trihidratada por espectrofotometría UV	19
Estandarización de la metodología para los estudios de Solubilidad	20
Estudios de Solubilidad	21
Tratamiento y Análisis de Datos	21
Preparación de los Sistemas Buffer	22
8. Resultados y Discusión	23
Obtención y caracterización del cloruro del copolímero de Dimetilaminoetil Metacrilato (cloruro de Eudragit® E100)	23
Caracterización Estructural	24
Caracterización de la morfología externa de los materiales de trabajo.	26
Estudios de saturación de la ampicilina trihidratada en medios biorrelevantes..	27
9. Conclusiones	32
10. Recomendaciones	33
11. Agradecimientos	34
12. Bibliografía	35
ANEXO 1. Validación de la Metodología Analítica	40
Selectividad	40
Repetibilidad	43
Repetibilidad del sistema	43
Repetibilidad del método	45
Linealidad	47
ANEXO 2. Estandarización de la Metodología para los estudios de Solubilidad	51
Evaluación del efecto del tipo de agitación en el proceso de saturación de fase líquida (agitación angular, Agitación orbital y agitación magnética)	51
Evaluación del efecto de la velocidad de agitación en la saturación de fase líquida mediante utilización de agitación orbital	52
ANEXO 3. Procesamiento estadístico de los resultados	54
ANEXO 4. Estudios Previos	55

Determinación de la homogeneidad de la temperatura en el baño termostatado	55
Verificación de la hermeticidad de los tubos	56
Determinación de la concentración de saturación del fármaco	57
Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Sódica	57
Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada	58
ANEXO 5. Preparación de las soluciones Buffer	59
Preparación del buffer de pH 1,2 y fuerza iónica 0,15 M.....	59
Preparación del buffer de pH 7,4 y fuerza iónica de 0,15 M.....	60
ANEXO 6. Certificados de análisis de las materias primas utilizadas	63
ANEXO 7. Estructura y espectro FTIR del Eudragit E-100, tomado de la ficha técnica del Eudragit E-100 de Evonic (Evonic, Thecnical Information)	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de ampicilina trihidratada disuelta en medios biorrelvantes, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura.	30
Tabla 2. Datos repetibilidad del sistema en agua	43
Tabla 3. Datos repetibilidad del sistema en buffer pH 7,4	44
Tabla 4. Repetibilidad del sistema a pH 1,2	44
Tabla 5: Resultados de repetibilidad del sistema en los tres medios	45
Tabla 6: Repetibilidad del método en agua	45
Tabla 7: Repetibilidad del método a pH 7,4.....	46
Tabla 8. Repetibilidad del método a pH 1,2.....	46
Tabla 9: Resultados de la Repetibilidad del método en los tres medios	47
Tabla 10: Ecuaciones de las Curvas de Calibración a las tres condiciones evaluadas.	48
Tabla 11. Resultados de los valores S_0 de los estudios de solubilidad.....	54
Tabla 12. Resultados del Análisis de Varianza realizado a los valores S_0 de cada medio biorrelevante en presencia y ausencia del polímero.	54
Tabla 13. Ubicación de los termómetros dentro del agitador termostato.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la Ampicilina trihidratada	8
Figura 2. Núcleo betalactámico.....	8
Figura 3. Estructura Química del sistema poliémico Eudragit® E.....	11
Figura 4. Representación de la interacción electrostática del Eudragit® E con un fármaco aniónico débil, para la formación de un complejo de asociación iónica fármaco-polímero.....	11
Figura 5. Perfiles de solubilidad a) en función del tiempo, b) estándar (Jiménez, 1994).....	14
Figura 6. Esquema de formación de sistema Ionomérico obtenido a partir del Eudragit® E, en medio ácido.	17
Figura 7. Modelo del proceso de diálisis con membrana. Las moléculas grandes permanecen retenidas dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas pequeñas difunden a través de la membrana en dos direcciones hasta alcanzar un equilibrio.	18
Figura 8. Fotografías de los equipos utilizados para la saturación de fase acuosa de la ampicilina. A. Equipo de agitación orbitalaria. B. Equipo de agitación radial. C. Equipo de agitación magnética.	21

Figura 9. Gráfico de la conductividad respecto al tiempo del Eudragit® E-100	24
Figura 10. Espectro de FTIR para el Eudragit®E-100 (----) y el Ionómero del Eudragit E-100(-----).	25
Figura 12. Micrografías de escaneo electrónico para el fármaco y los materiales poliméricos de estudio.	26
Figura 13. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en tres medios biorrelvantes. (○) Agua pura tipo II, (Δ) medio buffer pH 7.4 con $I_m=0.15M$ y (□) medio buffer pH 1.2 con $I_m=0.15M$, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura.....	27
Figura 14. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en medio buffer pH 7.4 con $I_m=0.15 M$, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura. (◇) Medio sin Eudragit® E-100 modificado. (o) Medio con Eudragit® E-100 modificado.	29
Figura 15. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en medio buffer pH 1.2 con $I_m=0.15M$, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura. (◇) Medio sin Eudragit® E-100 modificado. (o) Medio con Eudragit® E-100 modificado.....	29
Figura 16. . Barridos ampicilina trihidratada en a) agua, b) buffer pH 7,4, c) buffer pH 1,2 a 25, 30, 35, 37 y 40°C.....	42
Figura 17. Curvas de Calibración en agua a las 4 temperaturas estudiadas.	48
Figura 18. Curvas de Calibración en buffer pH 1,2 a las 4 temperaturas estudiadas.	49
Figura 19. Curvas de Calibración en buffer pH 7,4 a las 4 temperaturas estudiadas.	50
Figura 20. Sellado de cada vial para el agitador angular con parafilm.....	51
Figura 21. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en agua a 37°C, utilizando los equipos de agitación orbital (□), agitación magnética (Δ) y agitación radial (◇).....	52
Figura 22. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en agua a 37°C utilizando el equipo de agitación orbital (Shaker) a 200 rpm (◇), 350 rpm (□) y 500 rpm (Δ).....	53
Figura 23. Ubicación de los termómetros en el baño y registro de las temperaturas de los cuatro termómetros	55
Figura 24: Comportamiento de la temperatura en diferentes puntos del baño termostatado del equipo carrusel (agitación radial).	56

1. RESUMEN

En éste proyecto se evaluó la capacidad del material polimérico anfifílico, sal cloruro de Eudragit® E-100, para modificar las propiedades termodinámicas de solubilización del fármaco Ampicilina trihidratada en medios acuosos de disolución y con ello, establecer su potencialidad como material polimérico útil para el diseño de formas farmacéuticas de antibióticos beta-lactámicos efectivos en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos de este tipo. Inicialmente, se obtuvo el material polimérico siguiendo metodologías estandarizadas en el laboratorio de investigación en Fisicoquímica Farmacéutica de la Universidad Icesi, partiendo de un proceso químico de protonación en medio ácido, para luego proceder a la purificación por metodologías de diálisis y liofilización. Posteriormente, se desarrolló una técnica analítica por espectroscopia ultravioleta, para la cuantificación de la ampicilina trihidratada a las condiciones de estudio. Por otro lado, se evaluaron y estandarizaron tres metodologías para la saturación de fases líquidas acuosas, por parte de la ampicilina trihidratada, enfocadas a la obtención de los valores de solubilidad intrínseca del fármaco de estudio. Finalmente, se evaluó la incidencia del material polimérico obtenido, sobre la solubilidad intrínseca de la ampicilina trihidratada en ausencia y presencia del mismo, encontrándose diferencias significativas cuando dicho material se encuentra presente en la fase de disolución del fármaco.

Palabras clave: Estudios de solubilidad, Sistemas poliméricos, Ampicilina Trihidratada, Eudragit® E-100

2. ABSTRACT

In this project we evaluated the ability of the amphiphilic polymeric material Eudragit® E-100 chloride salt to modify the solubilization thermodynamic properties of ampicillin trihydrate drug in aqueous dissolution media, and thus, to establish its potential as a useful polymeric material for the design of dosage forms of beta-lactamic antibiotics looking for effectiveness in the treatment of infections caused by antibiotic-resistant microorganisms of this type. Initially, the polymeric material was obtained following standardized methodologies in the research laboratory in physical chemistry at Icesi University, starting with a chemical process of protonation using acid medium. Then, dialysis and lyophilization methodologies were performed to purify the bulk solution. Subsequently, one analytical technique was developed by ultraviolet spectroscopy to quantify ampicillin at study conditions. Furthermore, three methodologies for the aqueous liquid phases saturation were evaluated and standardized, by ampicillin trihydrate, aimed to obtain the intrinsic solubility values of the studied drug. Finally, the effect of the obtained polymeric material on the ampicillin trihydrate intrinsic solubility was tested in absence and presence of the polymeric material. Significant differences were found when such material is present in the solution phase of the drug.

Keywords: Solubility studies, Polymeric Systems, Ampicillin Trihydrate, Eudragit® E-100

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es evaluar el efecto de la asociación entre el polímero Eudragit® E-100 y el antibiótico ampicilina trihidratada sobre su solubilidad acuosa a los valores de pH 1.2 y 7.4, fuerza iónica de 0.15molL^{-1} y a 37°C .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar y caracterizar estructuralmente el sistema cloruro de Eudragit® E-100 adaptando métodos descritos en la literatura.
- Obtener parámetros de validación para la cuantificación de ampicilina trihidratada utilizando la técnica espectrofotométrica ultravioleta (UV).
- Estandarizar una metodología para la saturación de fase líquida (solubilidad) de la ampicilina trihidratada.
- Evaluar el efecto en la saturación de fase de la ampicilina trihidratada a dos condiciones de pH (1.2 y 7.4) y a 37°C en presencia y ausencia del polímero Eudragit® E-100.

4. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y desarrollo de los antibióticos de primera generación fue la solución a los problemas de infecciones bacterianas, sin embargo, debido a que no se valoró su potencial riesgo y se les empezó a dar un mal uso, las bacterias comenzaron a generar mecanismos de protección contra estos, que es lo que hoy se conoce como resistencia bacteriana (Fernandez, 2003).

Por tanto, se hace necesario buscar nuevas estrategias que conlleven a un uso adecuado de estos agentes terapéuticos, así como la búsqueda de nuevas moléculas con potencial antibiótico y de diseño de nuevas formas farmacéuticas de dosificación que confieran mejores características de estabilidad fisicoquímica y biológica.

En general, la pérdida de actividad farmacológica de éste tipo de antibióticos, conllevan a la búsqueda de nuevos tratamientos terapéuticos que generan un incremento en el costo económico (Heinemann, 2002). Debido a esto, el enfoque del proyecto radica en buscar un nuevo diseño para poder realizar formulaciones farmacéuticas para la ampicilina, por medio del desarrollo de nano-sistemas de asociación polimérica con dicho antibiótico. Con lo cual se pretende evitar inicialmente la degradación fisicoquímica del mismo, por factores externos, así como la biodegradación enzimática por microorganismos biológicos.

El objetivo general de este proyecto es evaluar el efecto de la asociación entre el polímero Eudragit® E-100 y el antibiótico ampicilina trihidratada sobre su solubilidad acuosa a los valores de pH 1.2 y 7.4, fuerza iónica de 0.15 y a 37°C. Para alcanzarlo se tienen 4 objetivos específicos: el primero es sintetizar, purificar y caracterizar estructuralmente el sistema cloruro de Eudragit® E-100 adaptando métodos descritos en la literatura. El segundo es la obtención de parámetros de validación para la cuantificación de ampicilina trihidratada utilizando la técnica espectrofotométrica ultravioleta (UV). El tercero es la estandarización de una metodología para la saturación de fase líquida (solubilidad). Y por último se desea evaluar el efecto en la saturación de fase de la ampicilina trihidratada a dos condiciones de pH (1.2 y 7.4) y a 37°C en presencia y ausencia del polímero Eudragit® E-100. Este copolímero se caracteriza por ser de carácter catiónico, y por ser soluble en fluido gástrico a pH inferior a 5 (Evonik, Technical Information).

El copolímero Eudragit® E 100, tiene un carácter anfipático dado que tiene grupos funcionales que le confieren cierta polaridad como los ésteres o la amina terciaria,

pero también tiene grupos hidrocarbonados que son bastante hidrofóbicos, esta propiedad lo hace ideal para desarrollar los nano-sistemas o pseudo fases en asociación con la ampicilina trihidratada.

Para lograr el objetivo general de este proyecto, se realizaron perfiles de solubilidad utilizando un sistema de agitación orbital. La determinación de los perfiles de solubilidad es un factor muy importante en la evaluación del comportamiento de un determinado fármaco en el organismo, ya que la solubilización del mismo es esencial para su biodisponibilidad, debido a que influye directamente en su absorción (Liu, 2006).

5. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN Y ESTADO DEL ARTE

La pregunta a la que se busca dar respuesta con la realización de este proyecto de grado es: ¿Qué influencia tiene el polímero Eudragit® E-100 en las características fisicoquímicas de la ampicilina trihidratada?

Esta investigación contribuye al desarrollo de trabajos científicos interdisciplinarios, donde se combina la investigación básica y aplicada con proyecciones al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos con mejores características farmacotécnicas, biofarmacéuticas y de estabilidad fisicoquímica y biológica. La propuesta investigativa radica en evaluar la potencialidad del cloruro de Eudragit® E-100, como novedoso sistema excipiente de medicamentos. En este sentido, se espera que el polímero Eudragit® E-100 modificado pueda auto-organizarse en medio acuosos generando nano y micro agregados hidrofóbicos, donde sea posible asociar sustratos farmacológicos por medio de interacciones específicas con las pseudofases poliméricas; y así, puedan mejorar las características fisicoquímicas de la ampicilina trihidratada. Debido a estas asociaciones específicas generadas por el sistema fármaco-polímero, esperamos evidenciar su potencial aplicación como matrices farmacéuticas que mejoren las características fisicoquímicas del fármaco, y con ello, produzcan un mejoramiento en diferentes procesos bio-farmacéuticos, así como de bioestabilidad frente a microorganismos productores de enzimas que pueden degradar a los agentes farmacológicos, tal como sucede con los agentes farmacológicos beta-lactámicos.

6. MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES

El gran uso de antibióticos a partir de los años cuarenta ha sido uno de los principales logros del siglo pasado. Inicialmente se creía que el tratamiento era definitivo y las enfermedades infecciosas irían desapareciendo con el tiempo; sin embargo, pocos años después del inicio de su uso se descubrió que las bacterias eran capaces de generar mecanismos de defensa contra los medicamentos, y en los años 50 se conoció la primera sepa resistente, el *Staphilococcus aureus* (Pérez, 1998).

Desde un punto de vista simple y práctico, una bacteria es sensible a un antibiótico cuando este es eficaz frente a ella y se logra la curación de la infección; pero por el contrario, la bacteria es resistente cuando solo puede ser afectada a concentraciones muy superiores a las que logra el fármaco en el sitio de acción o lugar de infección (García, 1997).

ASPECTOS GENERALES DE LA AMPICILINA

La ampicilina (ver figura 1), al ser un antibiótico β -lactámico de amplio espectro (ver figura 2), inhibe la síntesis de la pared celular de bacterias gram-positivas y algunas gram-negativas al prevenir el entrecruzamiento de péptidos de los enlaces tetrapéptidos de las cadenas laterales de peptidoglicano. Debido a su mecanismo de acción, este antibiótico se considera bactericida, ya que va a ocasionar la muerte inmediata a las bacterias. Sin embargo, en años recientes los microorganismos han generado mecanismos defensivos que pueden evadir la acción destructiva de los antibióticos y además ha disminuido considerablemente la producción de nuevos antibióticos que puedan combatir los problemas de infecciones (Rang & Dale, 2008, pp. 646.660).

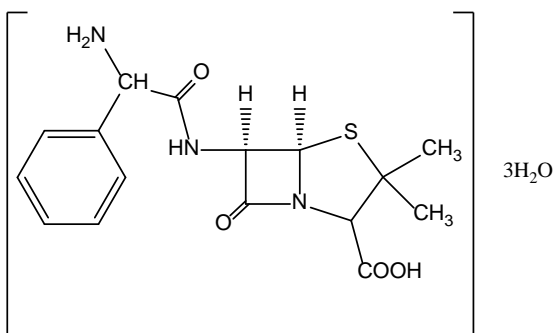


Figura 1. Estructura química de la Ampicilina trihidratada

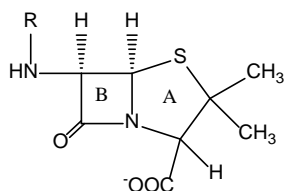


Figura 2. Núcleo betalactámico

De manera general, estos antibióticos se administran por vía oral o, en las infecciones más graves, por vía intravenosa. La ampicilina consiste en el antibiótico de primera elección frente a infecciones respiratorias, óticas, sinusales y meningitis causadas por microorganismos gram-negativos, como *Haemophilus influenzae*. Además, se emplea como tratamiento para la fiebre paratifoidea, faringitis bacteriana, gonorrea, neumonía, infecciones producidas principalmente por bacterias gram-positivas y gram-negativas como enterococos, *E. coli* y *Salmonella*. En cuanto a su distribución, se encuentra ampliamente perfundido en pulmones, hígado, riñones y piel (Rang & Dale, 2008, pp. 662.664).

ALTERNATIVAS DE SOLUCIÓN FRENTE A LA RESISTENCIA BACTERIANA

De acuerdo con lo anterior, se debe buscar alternativas nuevas y mejores para tratar de solucionar el problema, entre ellas se encuentra la búsqueda de nuevas moléculas con mayor potencial antibiótico frente a microorganismos resistentes, capaces de inhibir las betalactamasas, lo cual requiere una gran inversión de años y esfuerzo en investigación de nuevas moléculas; otras opciones consisten en el mejoramiento de las características fisicoquímicas de los fármacos ya existentes y la bioprotección por fenómenos de asociación con matrices macromoleculares biocompatibles, esto con el fin de proveer un mejor perfil farmacocinético a los antibióticos ya disponibles y de uso común. Una estrategia novedosa en

investigación, es asociar principios activos con sistemas poliméricos hidrosolubles, con capacidad de auto organizarse en solución acuosa generando nanoambientes, en los que es posible incorporar moléculas farmacológicas a partir de la asociación con pseudofases poliméricas, puesto que estas son capaces de actuar como una barrera física frente a los sistemas enzimáticos encargados de hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos que lo poseen en su estructura. En numerosos estudios se han utilizado diversos sistemas poliméricos asociados a fármacos, mejorando la solubilidad de estos en medios acuosos, además de su estabilidad fisicoquímica y biológica (Salamanca, 2011).

SISTEMAS POLIMÉRICOS COMO MATRICES FARMACÉUTICAS

Una de las características fundamentales que deben presentar los sistemas poliméricos para ser utilizados como matrices farmacéuticas, es que estos deben tener una macro-estructura química que les confiera bio-compatibilidad a los preparados farmacéuticos, además de presentar una mejoría en las características fisicoquímicas, farmacotécnicas y biológicas de los agentes farmacológicos. En este sentido, los sistemas poliméricos que puedan solubilizarse en medios acuosos y contener o asociar a diferentes agentes farmacológicos, brindándoles estabilidad de tipo químico y biológico, corresponden al modelo ideal que se debe alcanzar al momento de diseñar una nueva forma farmacéutica. Uno de los sistemas macromoleculares que ha mostrado estas características necesarias para el diseño de potenciales matrices farmacéuticas, corresponde a los sistemas poliméricos de tipo iónico. En general, podemos definir a los polímeros iónicos como sistemas macromoleculares que presentan una fracción significativa de cargas en su cadena principal polimérica, por lo que comúnmente se denominan polielectrólitos o poliiiones (Abuin, 1984) (Olea, 1989). Estos se pueden clasificar según la carga como aniónicos, catiónicos o anfóteros; o bien, según la composición de monómeros como homopolímeros o copolímeros. Para el caso de copolímeros, se pueden sub clasificar según la distribución secuencial de los comonómeros, como aleatorios, alternantes y en bloque. Por otra parte, también es posible adicionar grupos funcionales hidrofóbicos a dichos sistemas poliméricos (cadenas laterales poliméricas), con lo que se obtienen poli-electrólitos con mayores propiedades anfipáticas cuando se encuentran en solución acuosa, similares a las exhibidas por los agentes surfactantes convencionales. Dentro de estas propiedades se encuentra la capacidad de formar sistemas nano y micro heterogéneos, semejantes a las micelas y/o vesículas (Goddard, 1993). Esta propiedad se debe a la capacidad de la macromolécula de auto organizarse

cuando se encuentra en solución, adquiriendo diferentes conformaciones, en virtud de diferentes tipos de interacciones moleculares que se presentan en el sistema.

En general, estas características particulares que presentan los polímeros iónicos en solución, ha generado mucho interés en el ámbito industrial, ya que se han podido aplicar en muchos procesos tecnológicos, al permitir el uso de soluciones acuosas de dichos polímeros en vez de solventes orgánicos (Glass, 1989), reduciendo de esta manera costos y haciendo que los productos manufacturados sean más tolerables por el medio ambiente (Hansson, 1996). Hasta ahora se destaca su aplicación en la recuperación del petróleo (Lindman, 1993), flotación de minerales (Somasanduran, 1981) y en la industria farmacéutica y cosmética (Allen, 1998) (Salvage, 2003). En estos últimos ejemplos los polímeros iónicos se vienen utilizando principalmente como componentes de matriz o excipientes que mejoran la liberación del fármaco en los fluidos corporales (drugs delivery system), y en algunos casos como moduladores farmacodinámicos, debido a que algunos sistemas pueden producir efectos biológicos al interactuar con receptores de membrana activando la permeabilidad de éstas (Kabanov, 2003). En el ámbito de la industria farmacéutica los polímeros que se vienen utilizando principalmente como sistemas de transporte de fármacos (drug carrier) o bien como sistemas contenedores o reservorios de fármacos (drug reservoir), son aquellos que presentan en su estructura macromolecular, grupos tales como, ésteres, lactónicos, carboxilos y anhídridos (Bacu, 2002), debido a que son grupos funcionales biocompatibles (Lasic, 1992). En este contexto podemos definir varios sistemas polielectrólitos, tales como el Eudragit® y los copolímeros que contienen grupos anhídridos, como el itacónico o maléico, los cuales pueden ser utilizados en el diseño y el desarrollo de diseños y formulaciones de novedosas formas farmacéuticas (Trivedi, 1982).

En relación a los polímeros comerciales Eudragit® (Baena, 2011), existe una gran variedad de sistemas poliméricos en virtud de su peso molecular y la distribución de las unidades monoméricas que conforman la macro-estructura polimérica, de los cuales se destaca el sistema polimérico Eudragit® E, que corresponde a un copolímero aleatoriamente distribuido por unidades monoméricas de butilmetacrilato, dimetil amino-etil y metacrilato en proporción 1:2:1. Este sistema polimérico se muestra a continuación en la figura 3:

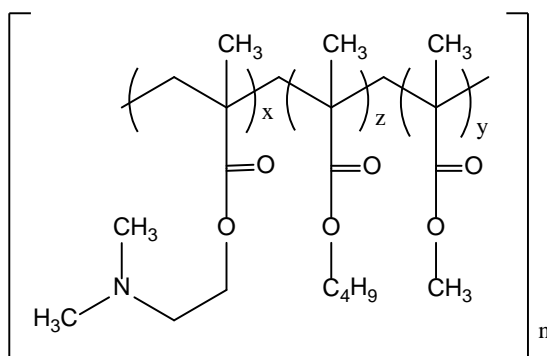


Figura 3. Estructura Química del sistema polimérico Eudragit® E

Estos copolímeros del Eudragit® E pueden adquirir carga cuando se encuentran en medios acuosos acidulados, formando macro-estructuras catiónicas, tales como las observadas para un macro-ión soluble en agua, lo cual le permite generar zonas interfaciales específicas que pueden interactuar electrostáticamente con moléculas iónicas de carga opuesta, generando así un tipo especial de complejos denominados complejos de asociación iónica o electrostática polímero-fármaco, tal como se muestra a continuación en la figura 4.

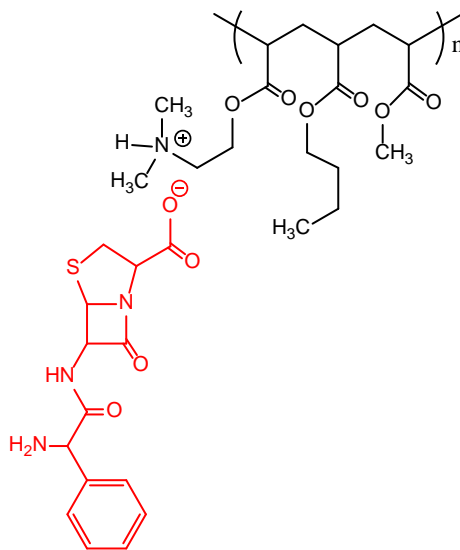


Figura 4. Representación de la interacción electrostática del Eudragit® E con un fármaco aniónico débil, para la formación de un complejo de asociación iónica fármaco-polímero.

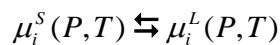
Esta característica, además de las mencionadas anteriormente y relacionadas con la biocompatibilidad, ha llevado a que el Eudragit®, sea un sistema polimérico muy utilizado como modificador de las características fisicoquímicas y biofarmacéuticas

de una gran cantidad de agentes farmacológicos. A continuación se realiza una breve descripción de una serie de estudios relacionados con la formación de complejos de asociación iónica polímero fármaco: Graham et al. investigaron la formación de complejos entre 28 hidrocoloides, tales como carragenina, carboximetilcelulosa y alginato sódico y varios fármacos tranquilizantes e hipotensores (promazina, clorpromazina, reserpina, entre otros), evaluando variables como el pH, la temperatura, la fuerza iónica y el tiempo sobre la interacción presentada (Graham, 1963). Por otro lado, Jablon et al., evaluaron la liberación in vitro e in vivo de clorpromazina a partir de tabletas constituidas por un complejo polielectrolito-fármaco, empleando como sistema polimérico a la carboximetilcelulosa sódica y al sulfato de protamina, demostrando un control de la liberación en los estudios realizados in Vitro (Jablon, 1970). Bonferoni et al. caracterizaron el complejo formado entre lambda carragenina y diltiazem clorhidrato y evaluaron la influencia del pH y la fuerza iónica sobre la liberación del fármaco a partir del complejo, encontrando que el pH no tiene una influencia significativa sobre la liberación mientras la fuerza iónica sí (Bonferoni, 2000). Jiménez-Kairuz et al., estudiaron el mecanismo de liberación de la lidocaina a partir de un complejo carbómero-lidocaina en dispersión, demostrando que este actuaba como un reservorio que conducía a una liberación más lenta de la lidocaina, siendo la disociación del complejo el paso más lento que controlaba la velocidad de liberación (Jimenez-Kairuz, 2002). Vilches et al. evaluaron la cinética de liberación de dos fluoroquinolonas (norfloxacina y ciprofloxacina) a partir del complejo formado entre estas y un carbómero como polielectrolito, encontrándose una cinética de liberación que seguía un orden cero (Vilches, 2002). Khalil y Sallam, evaluaron la interacción presentada entre el diclofenaco sódico y el diclofenaco dietilamina con los polímeros Eudragit® RL y RS en solución acuosa, frente a variables como la temperatura, el pH, la presencia de algunos tensioactivos y la fuerza iónica. Adicionalmente se realizaron estudios de disolución in vitro, del complejo formado en estado sólido en diferentes medios de disolución (presencia de surfactantes en diferentes concentraciones, buffer pH 6.8 y agua) y diferentes condiciones, encontrándose una dependencia de las interacciones entre el fármaco y el polímero con la temperatura, la fuerza iónica y la naturaleza de los tensioactivos (Khalil, 1999). Quinteros et al., estudiaron la interacción entre el Eudragit® E y siete fármacos, donde se encontró una mayor liberación de cada fármaco evaluado cuando estos se encontraban asociados al polímero Eudragit® E100 (Quinteros, 2008). Finalmente, cabe resaltar además un estudio realizado con el Itraconazol, fármaco muy poco soluble en medios acuosos, donde se observó una variación de la solubilidad de dicho fármaco en medios biorrelavantes con valor de pH 1.2 desde 1.8 µg/mL hasta 254.5 µg/mL

(Jung, Yoo, 1999), mostrando claramente el efecto modulador por parte del material polimérico de interés en nuestro estudio.

ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Los estudios de solubilidad, también conocidos como estudios de saturación de fase líquida por parte de solutos adicionados a un sistema de mezcla homogénea, corresponden a un proceso de equilibrio termodinámico que se genera entre el soluto en estado sólido y el soluto en estado líquido disuelto a una condición específica de presión, temperatura y composición de medio continuo, tal y como se muestra a continuación:



Donde μ_i^S corresponde al potencial químico del soluto sólido o soluto no disuelto, mientras que μ_i^L corresponde a la fracción o cantidad de soluto en estado líquido disuelto en el medio solvente, el cual puede ser un sistema puro o bien un sistema multi-componente de mezcla. En el ámbito farmacéutico, este parámetro termodinámico es muy importante y más aún en aquellos medicamentos que se administran por vía oral, dado que la biodisponibilidad depende en primera instancia de la cantidad o fracción de principio activo que logra disolverse en el medio fisiológico para posteriormente ser absorbido y distribuido hasta alcanzar su sitio de acción farmacológica (Shargel, 1999). Por otro lado, en la etapa de estudios de preformulación de medicamentos, también se hace muy importante realizar estudios completos de solubilidad de fármacos en diferentes condiciones y principalmente en aquellas enfocadas a evaluar la modificación de dicha propiedad termodinámica por la acción de otros componentes de la formulación a desarrollar o evaluar (Jiménez, 1994). En general se pueden describir varios métodos para determinar la solubilidad de un fármaco; entre los que más se utilizan están la determinación de la solubilidad en función del tiempo de equilibrio, y la determinación de la solubilidad estándar o de saturación de fase líquida, donde es posible obtener el valor de solubilidad intrínseca a una condición termodinámica específica. La primera metodología consiste en adicionar una cantidad fija de fármaco a todos los viales o frascos, y a esta agregarles una cantidad también fija de solvente; la agitación empieza y se analiza el equilibrio alcanzado a unos intervalos de tiempo definidos, este método es de mucha aplicación para el caso en que los solutos no se degraden por acción del solvente u otra condición específica cuando se encuentran disueltos. En el caso tal que se

presente esta situación, se utiliza habitualmente un segundo método relacionado con la adición de diferentes cantidades de soluto sólido exactamente pesados a una cantidad fija de solvente, para el cual se crea un perfil de cantidad de saturación de fase líquida a partir de cantidad adicionada de soluto en relación a la fracción disuelta o determinada experimentalmente por alguna técnica analítica de cuantificación. Además se debe mantener una condición de agitación y tiempo fijo, para el cual este es establecido en virtud de a la condición de degradación del soluto (Jiménez, 1994).

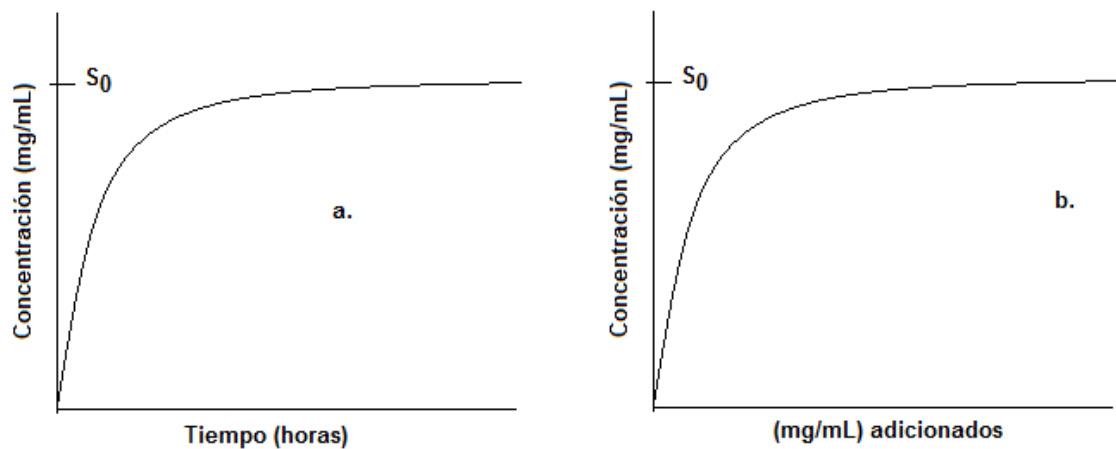


Figura 5. Perfiles de solubilidad a) en función del tiempo, b) estándar (Jiménez, 1994).

Estos perfiles sirven para determinar la concentración de saturación o S_0 del fármaco en presencia del medio y el pH a evaluar. Por tanto, estos parámetros nos dan información vital acerca los mecanismos de asociación y liberación de la ampicilina por parte de los materiales de estudio en esta investigación.

Estudios anteriores han mostrado que la ampicilina trihidratada tiene una solubilidad de 5,4 mg/mL en una solución acuosa de buffer fosfato pH 5.8 (0.01M) y con temperatura controlada a 25°C (Liu, Chang, 2006).

APORTE INTELECTUAL DEL INVESTIGADOR

Este proyecto tiene un gran aporte a las Ciencias Naturales, ya que ciertos antibióticos que se les ha encontrado un alto nivel de resistencia bacteriana

podrían volver a ser utilizados. Las bacterias generan mecanismos defensivos contra los antibióticos sintetizados por el hombre, generando enzimas que los degradan o los expulsan fuera de las células; la incorporación de estas moléculas en matrices biológicas biocompatibles, probablemente evitaría su degradación enzimática.

El impacto económico de este estudio es muy alto ya que hasta 1997 desarrollar un nuevo medicamento costaba alrededor de US \$500 millones y además se demoraba entre 12 y 15 años (Marovac, 2001); por esta razón resulta muy inconveniente pensar en desarrollar nuevos antibióticos cada vez que se genere resistencia a uno ya existente.

La alternativa de asociar la molécula farmacológica a un sistema polimérico y que esto le dé capacidad de resistir los mecanismos de protección de las bacterias y lograr cumplir su acción farmacológica, es una nueva propuesta que brinda la posibilidad de continuar utilizando estos antibióticos en enfermedades infecciosas que actualmente podrían considerarse sin tratamiento farmacológico.

Toda la información que entrega este proyecto de grado puede ser utilizada a futuro en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de ampicilina trihidratada, pero también podría ser útil frente a otros fármacos que presenten sus mismas condiciones.

IMPACTO AMBIENTAL

El desarrollo de nuevos materiales biocompatibles y biodegradables, tales como es el caso de los materiales poliméricos que se desarrollaran en el proyecto, conllevan a que los procesos industriales sean más limpios y tolerados por el medio ambiente, ya que este tipos de materiales permiten la utilización completa de sistemas acuosos, evitando que los procesos se utilicen solventes orgánicos.

7. METODOLOGÍA

MATERIALES

Los compuestos utilizados en la sección experimental fueron: Ampicilina trihidratada y Eudragit® E-100 en forma de perlas, los cuales fueron proporcionados por laboratorios Tecnoquímicas S.A y las cuales venían junto con su correspondiente certificado de análisis de control de especificaciones de calidad que se encuentran en el anexo 6. Para el proceso de protonación se utilizó HCl concentrado marca Merck®. Para la preparación de los sistemas buffer con valor de pH de 1,2 y fuerza iónica de 0,15 M, se utilizó ácido clorhídrico y cloruro de potasio marca Merck®, mientras que para el buffer con valor de 7.4 y fuerza iónica de 0,15 M, se utilizaron fosfatos mono y dibásicos de potasio y cloruro de potasio marca Merck®, siguiendo métodos previamente establecidos en la farmacopea estadounidense vigente (USP 35-NF 30, 2012).

OBTENCIÓN DEL SISTEMA POLIMÉRICO CLORURO DE EUDRAGIT E-100 MODIFICADO

La obtención del material polimérico de estudio se realizó siguiendo métodos previamente estandarizados en nuestro laboratorio de investigación. Para esto se utilizó como material de partida el polímero comercial Eudragit E-100, con peso molecular promedio de 47000 mol. Este sistema polimérico se hizo reaccionar con una cantidad equimolar con soluciones acuosas de HCl concentrado, con el fin de generar las formas iónicas del material polimérico (ionómeros), tal como se muestra en la figura 6.

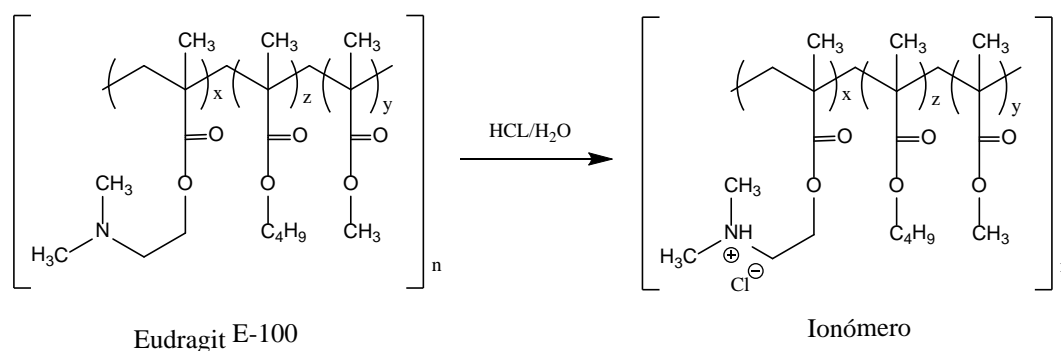


Figura 6. Esquema de formación de sistema Ionomérico obtenido a partir del Eudragit® E, en medio ácido.

PURIFICACIÓN

Una vez formado el sistema ionomérico obtenido a partir del Eudragit® E-100 en medio acuoso acidulado, se procedió a filtrar al vacío dichas soluciones, utilizando papel filtro marca Waltman® Grado 1:11 μm , con el fin de eliminar las partículas suspendidas correspondientes al polímero que no se hidrolizó. Posteriormente, se sometieron a procesos de diálisis y liofilización, que se explican a continuación.

DIÁLISIS DE LA SOLUCIÓN DE CLORURO DEL COPOLÍMERO DE DIMETILAMINOETIL METACRILATO (CLORURO DE EUDRAGIT® E100)

La solución polimérica concentrada se purificó por medio de procesos de diálisis, para lo cual se emplearon membranas de celulosa (Sigma Chemical Co) capaces de retener macromoléculas con peso molecular mayor a 12000 Dalton. A continuación, la solución del polímero preconcentrado, se adicionó en el interior de las membranas de celulosa, las cuales se sellaron y se depositaron en un baño de agua destilada de tal forma que toda la superficie de las membranas estuviera cubierta por esta, con el fin de favorecer el paso de iones y eliminar el exceso de los mismos, tal y como se muestra a continuación en la figura 7.

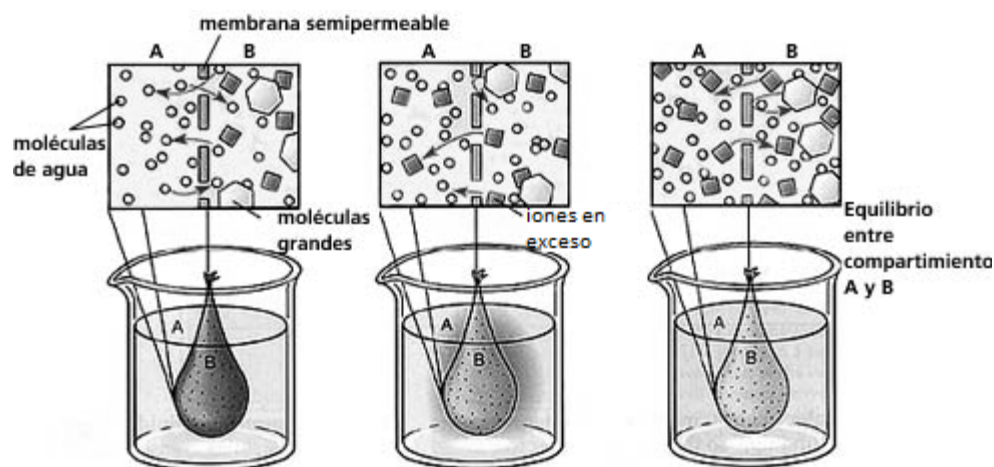


Figura 7. Modelo del proceso de diálisis con membrana. Las moléculas grandes permanecen retenidas dentro de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas pequeñas difunden a través de la membrana en dos direcciones hasta alcanzar un equilibrio.

De esta forma se eliminó el exceso de iones generados en la formación de los ionómeros, lo cual se monitoreó por medio de medidas de conductividad del agua externa a la membrana, la cual se reemplazó periódicamente hasta que se obtuvieron valores muy bajos de conductividad (5-20 μ siemens/cm) y de manera constante durante el tiempo.

LIOFILIZACIÓN

Para esto se utilizó un equipo marca Eyela® Freezer Dryer, donde cada solución polimérica se congeló con N_2 líquido en forma rotacional, con el fin de obtener un sistema homogéneo de capas que disminuyan el tiempo de sublimación del equipo.

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL MATERIAL POLIMÉRICO

Una vez obtenido y purificado el material polimérico se procedió a caracterizarlo por medio de un espectrofotómetro FTIR marca Thermo Fisher Scientific Nicolet 6700, el cual contiene el software Omnic para el tratamiento de los datos de análisis de los espectros obtenidos.

Una vez obtenido el material polimérico en estado sólido se procedió a caracterizarlo por medio de espectroscopia de infrarrojo, donde se evaluó la variación en las señales representativas. Para esto se empleó un

espectrofotómetro FTIR marca thermo Fisher Scientific Nicolet 6700, el cual contiene el software OMNIC para el tratamiento de los datos y el análisis de los espectros obtenidos.

CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LA MORFOLOGÍA EXTERNA DEL POLÍMERO

Debido a que la solubilidad de los compuestos, tanto de bajo peso molecular como de alto peso molecular depende de la morfología externa que estos posean, es decir de sus hábitos cristalinos, y dado que esta especificación rara vez se reporta dentro de los parámetros de control de calidad de los productos, se hace necesario, realizar una caracterización general de dicha propiedad. Por esta razón se obtuvieron las imágenes por microscopia electrónica de barrido para los materiales de trabajo, específicamente para la ampicilina y los sistemas poliméricos. Para esto se empleó un Microscopio electrónico de barrido (SEM) marca Phenom G2.

OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE AMPICILINA TRIHIDRATADA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV

La validación de un método analítico corresponde a un proceso mediante el cual queda establecido, por estudios experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. Esta se fundamenta en la determinación de diversos parámetros como son la selectividad, exactitud, precisión, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad y robustez, los cuales son importantes para el desarrollo de una metodología analítica ya que garantizan que esta genere resultados confiables y reproducibles. Por lo anterior, en este proyecto se hace necesaria la validación de una técnica analítica que permita cuantificar la ampicilina trihidratada en las condiciones de estudio. Para esto se determinaron algunos parámetros tales como: selectividad, linealidad, repetibilidad y precisión intermedia, con el fin de validar la metodología analítica para cuantificar la ampicilina trihidratada mediante la técnica ultravioleta por medio de un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Por otro lado, la preparación de las disoluciones acuosas de ampicilina se realizó empleando una balanza analítica marca Radwag AS 220 previamente calificada, micropipetas y balones volumétricos marca Brand, previamente calibrados y calificados. El agua utilizada

para los procesos de disolución de la ampicilina corresponde a agua tipo 2, como se define en la farmacopea de los estados unidos USP 35-NF 30, 2012. El procedimiento detallado, así como los resultados de la validación, se detallan en el anexo 1.

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LOS ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Con el fin de evaluar la metodología más óptima para realizar los ensayos de determinación de saturación de fase líquida o solubilidad intrínseca de la Ampicilina trihidratada en medio acuoso, en ausencia y presencia del material polimérico de estudio, se realizaron varios ensayos preliminares donde se evaluaron tres equipos con formas de agitación diferentes: agitación por movimiento angular, agitación orbital y agitación magnética tradicional. Para el caso de la agitación con movimiento angular, se evaluó previamente la homogeneidad en la Temperatura del baño donde se sumergen los viales, además de la hermeticidad de los mismos. Para el caso de la agitación orbital, se determinó el efecto de la velocidad de agitación sobre la saturación de fase, evaluando tres velocidades de agitación. Todos los resultados preliminares utilizados para evaluar las tres técnicas, se describen detalladamente en el anexo 2. Para la evaluación de la agitación angular sobre la solubilidad de la ampicilina en medio acuoso, se utilizó un equipo marca Centricol®, el cual fue realizado bajo especificaciones dadas por nuestro laboratorio de investigación y el cual cuenta con un carrusel sumergido en un baño termostatado, donde es posible depositar hasta seis viales con capacidad para almacenar entre 10- 25 mL de solución (ver figura 8 b.). Por otro lado, para la evaluación de la agitación orbital sobre la solubilidad de la ampicilina en medio acuoso, se utilizó un equipo marca Heidolph® - unimax 1010 acoplado a un sistema termostato para incubación Heidolph® 1000 (ver figura 8 a.). Finalmente, se evaluó el efecto de la agitación magnética sobre la solubilidad acuosa de la ampicilina, para lo cual se utilizó una plancha de calentamiento con agitación magnética marca IKA RT-15 (ver figura 8 c).

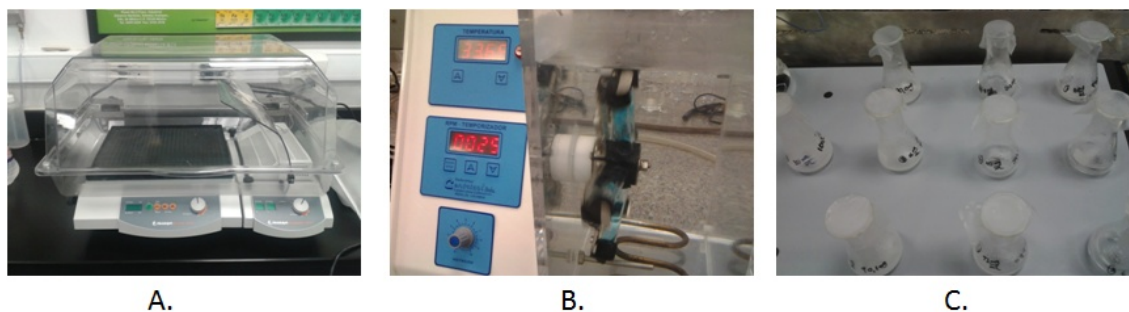


Figura 8. Fotografías de los equipos utilizados para la saturación de fase acuosa de la ampicilina. A. Equipo de agitación orbitalaria. B. Equipo de agitación radial. C. Equipo de agitación magnética.

ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

Los ensayos de solubilidad se realizaron siguiendo metodologías previamente estandarizadas en nuestro laboratorio. Inicialmente se determinó la concentración de saturación de la ampicilina trihidratada a 37°C, en tres medios correspondientes a agua y soluciones buffer con valores de pH de 1,2 y 7,4 respectivamente. Estos dos últimos medios con valores de fuerza iónica de 0.15 M. Luego se procedió a evaluar estos mismos sistemas, pero en presencia de los materiales poliméricos obtenidos, en proporciones polímero fármaco 1:1. Cada ensayo se realizó por triplicado, empleando el método de agitación termomecánica tipo orbitalaria utilizando un equipo marca Heidolph® unimax 1010 acoplado a un sistema de incubación Heidolph® 1000, con una velocidad de agitación de 350 rpm y a una temperatura de 37°C durante 30 minutos. Cada solución sobresaturada fue filtrada con membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.46 micras hasta obtener aproximadamente 4 mililitros de fase líquida saturada, la cual fue vertida en una celda de cuarzo previamente ambientada y termostalizada a la temperatura del ensayo, para posteriormente ser leída en un ultravioleta multicelda marca Shimadzu con referencia UV-1800, el cual se encuentra acoplado a un sistema de termocupla para garantizar un control de temperatura durante los proceso de lectura de cada ensayo.

TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Cada medida de absorbancia determinada en los ensayos de saturación de fase líquida o solubilidad (S_0), fue contrastada con las ecuaciones obtenidas en las

curvas de calibración que se muestran en el anexo 1. Una vez obtenidos los valores de la cantidad disuelta en la fase líquida a condiciones específicas de cada ensayo, se realizó un promedio aritmético y con este valor se graficaron los perfiles de saturación de fase acuosa, utilizando el programa computacional Microsoft® Excel para cada condición experimental evaluada. Una vez realizados los gráficos de los perfiles de saturación, se determinaron los valores de la solubilidad intrínseca de la ampicilina trihidratada a las condiciones evaluadas y con este parámetro se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de uno o dos factores, dependiendo del caso de estudio. Para cada diseño a utilizar se define al estadístico F, como el criterio de aceptación, de manera tal que si el valor F calculado es mayor que el F tabulado puede decirse, con un porcentaje de confianza (para este estudio se tiene que es 95%), que hay efecto significativo en las variables estudiadas. Cada análisis estadístico se realizó por medio del programa estadístico Microsoft® Excel (ver anexo 3).

PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS BUFFER

Los ensayos se llevaron a cabo en dos sistemas buffer, a un pH de 1,2 y 7,4, y con una fuerza iónica constante de 0,15 M. Se utilizó ácido clorhídrico y cloruro de potasio para el buffer ácido, mientras que para el buffer fisiológico se utilizaron fosfatos mono y dibásico de potasio y cloruro de potasio. Se siguieron las indicaciones de preparación de la farmacopea vigente (USP 35-NF 30, 2012) y se ajustó la fuerza iónica al valor requerido con cloruro de potasio (KCl) (ver anexo 5).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL CLORURO DEL COPOLÍMERO DE DIMETILAMINOETIL METACRILATO (CLORURO DE EUDRAGIT® E100)

Tal como se mencionó anteriormente en el apartado metodológico, la preparación del material polimérico se realizó a partir del copolímero comercial Eudragit® E-100, el cual se disolvió previamente en agua, y a la cual se le adicionaron gotas de HCl concentrado, que posteriormente se transformó en un sistema disuelto muy viscoso completamente homogéneo.

Este cambio observado en el proceso, donde se pasa de un sistema heterodisperso a un sistema homogéneo, se puede explicar debido a la protonación del grupo amino que genera grupos funcionales correspondientes a aminas cuaternarias a lo largo de la cadena principal polimérica, generando así, el sistema ionomérico que resulta ser más soluble en dicho medio, debido a las interacciones tipo ion-dipolo que se generan entre la macromolécula y el solvente acuoso, tal y como se muestra en el apartado de la metodología en la figura 6.

Una vez modificado el material polimérico se procedió con el proceso de diálisis, el cual consiste en disminuir la cantidad de electrolitos de la solución polimérica al sumergirla en agua destilada. Para corroborar que la carga de electrolitos en el sistema era la adecuada, se midió la conductividad del agua en la que estaba sumergido el polímero, este proceso se realizó hasta que la conductividad se volvió constante, lo cual se muestra en la figura 9.

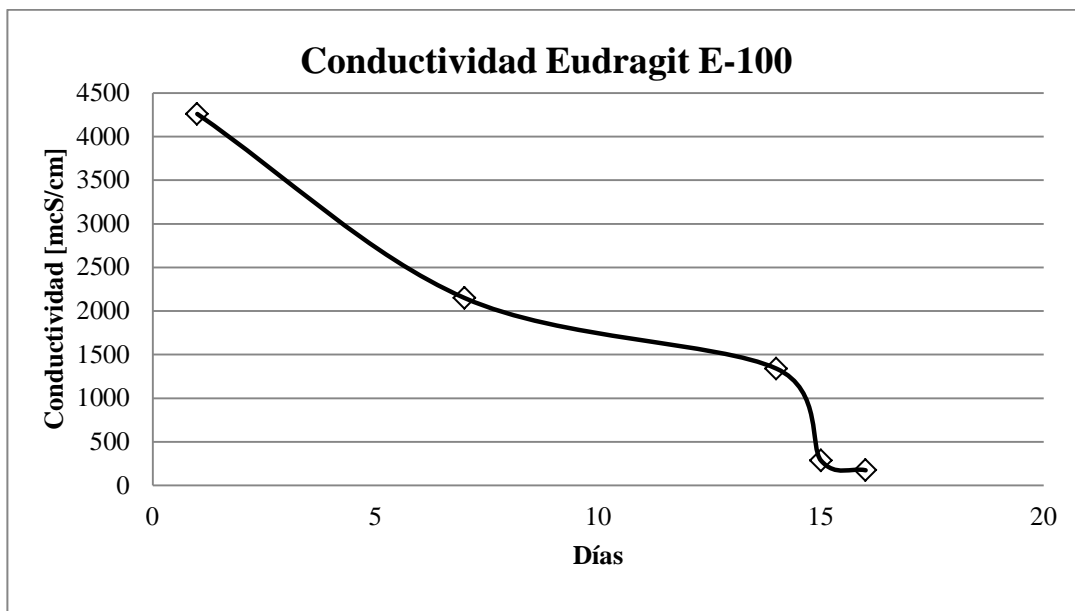


Figura 9. Gráfico de la conductividad respecto al tiempo del Eudragit® E-100

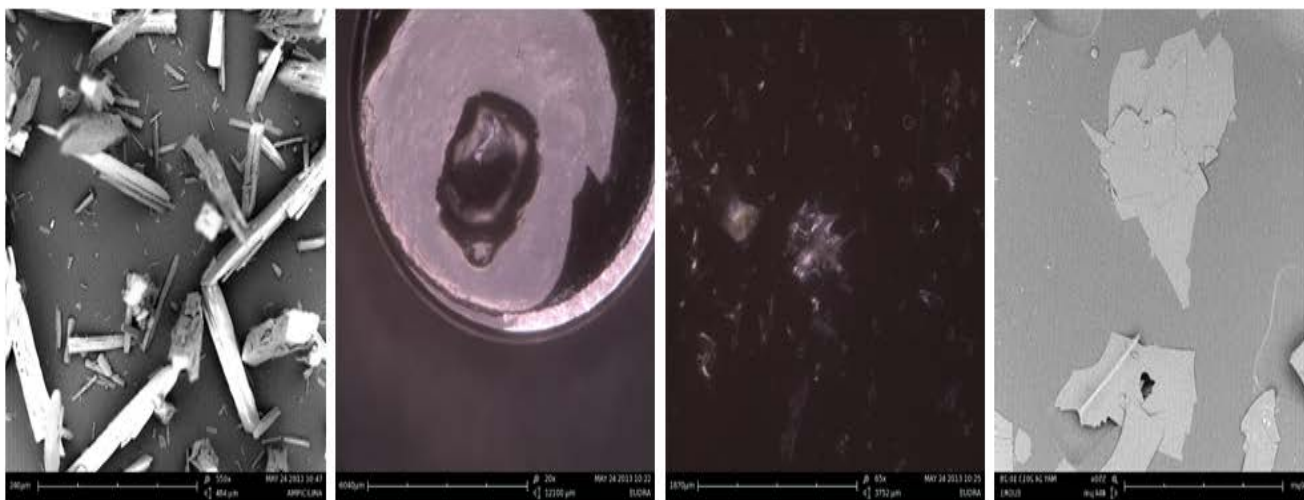
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Una vez formado el sistema Ionomérico a partir del Eudragit® E-100 en medios acidulado, y posteriormente purificado por procesos de diálisis y liofilización, tal como se definen en la parte metodológica, se procedió a caracterizarlo en estado sólido por medio de espectroscopia de FTIR. Para esto se obtuvieron los espectros tanto del material de partida como el del producto obtenido, como se muestra en las figuras 10 y 11.

presencia de dos señales próximas e intensas, tanto en el polímero precursor como en el sistema ionomérico formado a 2338 y 2358 cm^{-1} . Esta señal atípica y que no aparecen en los espectros mostrados por el fabricante (ver anexo tal), sugiere que la amina terciaria del material precursor Eudragit® E-100, puede tener un grado de oxidación típica para este tipo de sistemas, con lo cual se forma un óxido de amina terciaria, que dada su polaridad destaca una señal muy intensa en la zona de $2300\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$.

CARACTERIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA EXTERNA DE LOS MATERIALES DE TRABAJO

La caracterización de la morfología externa o del hábito cristalino, tanto para el fármaco de estudio como para los materiales poliméricos de partida y modificados, se debe realizar como parámetro fundamental de caracterización, ya que dicha condición puede variar significativamente el proceso de solubilización de dichos compuestos en medios acuosos. A continuación se muestran las micrografías de la Ampicilina trihidratada, Eudragit® E-100 y la sal cloruro de Eudragit® E-100 obtenidas bajo las condiciones de nuestros ensayos.



a. Ampicilina

b. Eudragit E-100

c. Cloruro de Eudragit E-100

Figura 11. Micrografías de escaneo electrónico para el fármaco y los materiales poliméricos de estudio.

De la figura anterior se aprecia que la ampicilina utilizada en nuestro estudio tiene una geometría de agujas. Mientras que el material polimérico Eudragit® E-100

corresponde a un pellet en forma de perlas, el cual una vez modificado adquiere una forma de placas delgadas.

ESTUDIOS DE SATURACIÓN DE LA AMPICILINA TRIHIDRATADA EN MEDIOS BIORRELEVANTES

Después de determinar que el equipo que ofrecía una mejor reproducibilidad en los resultados era el agitador orbitalario (Shaker), se evaluaron los perfiles de saturación de fase líquida por parte de la ampicilina trihidratada en los medios biorrelavantes de estudio, los cuales corresponden a agua purificada tipo II, solución buffer con valor de pH 7.4 y fuerza iónica de 0.15M y solución buffer con valor de pH 1.2 y fuerza iónica de 0.15M. Estos perfiles se muestran a continuación en la figura 13:

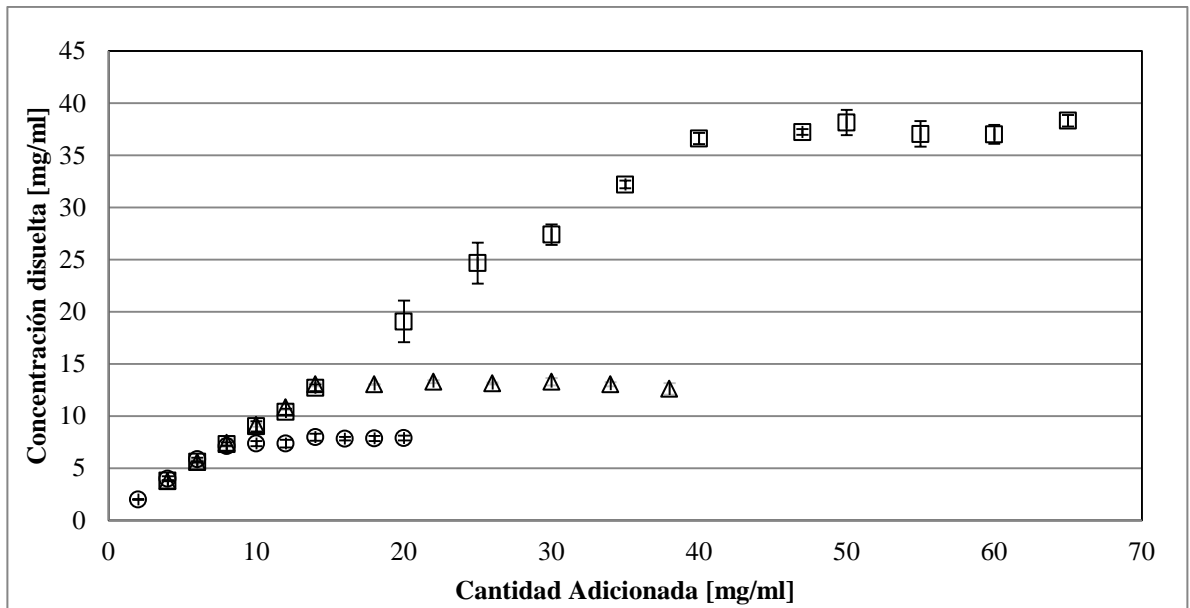


Figura 12. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en tres medios biorrelavantes. (○) Agua pura tipo II, (Δ) medio buffer pH 7.4 con $I_m=0.15M$ y (□) medio buffer pH 1.2 con $I_m=0.15M$, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura.

En la figura 13 se observa una clara diferencia entre los perfiles de saturación de la fase líquida del medio biorrelevante por parte de la ampicilina trihidratada, se aprecia que para el medio correspondiente a agua pura, se obtiene una rápida saturación de la fase líquida con un valor extrapolado de concentración disuelta

de 7 mg/mL, mientras que para el medio buffer con valor de pH 7.4, la saturación es ligeramente mayor con un valor aproximado de 13 mg/mL; sin embargo, para el medio buffer con valor de pH 1.2, se observa un mayor valor en la concentración disuelta de aproximadamente 36 mg/mL. Estos resultados se pueden explicar en virtud de la naturaleza anfotérica que presenta la ampicilina, la cual tiene dos valores de pKa de 2.65 y 7.24 (drugbank, 2013) y del modelo simple de Henderson-Hasselbalch para sistemas de electrolitos potenciales en disolución. De esta manera, cuando la ampicilina se encuentra en un medio acuoso puro, la molécula tiende a estar muy poco dissociada o muy próxima a la electroneutralidad, con lo cual la solubilidad de dicho soluto depende principalmente de interacciones moleculares tipo puente de hidrogeno. Por otro lado, cuando la ampicilina se encuentra en un medio con un valor de pH de 7.4, esta tiende a tener aproximadamente la mitad de sus especies en forma ionizada, mientras que en un medio con un valor de pH de 1.2 la ampicilina presenta una mayor fracción de especies iónicas, favoreciendo la formación de interacciones moleculares tipo ion-dipolo entre el soluto y el solvente y con ello, que se produzca un mayor efecto de solvatación con lo cual se incrementa el valor de la concentración disuelta en dicho medio.

Una vez evaluados los perfiles de saturación de fase líquida de la ampicilina trihidratada en los diferentes medios biorrelevantes, se procedió a evaluar el efecto de la incidencia del material polimérico modificado Cloruro de Eudragit® E-100 sobre dichos perfiles. Para esto se tomaron cantidades en proporción másica 1:1, basadas en los valores promedios de las concentraciones de ampicilina determinadas previamente de los perfiles de saturación de fase líquida y los cuales fueron aproximadamente de 36.26 mg/ml y 11.10 mg/mL, para el caso del medio buffer con valor de pH 1.2 y 7.4, respectivamente. Estos perfiles se muestran a continuación en las figuras 14 y 15:

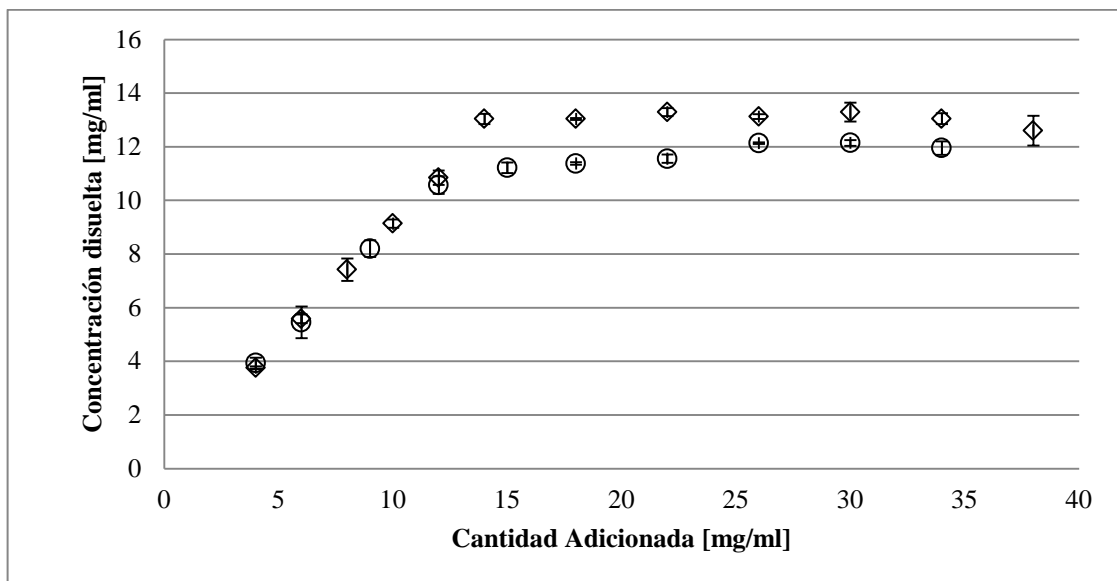


Figura 13. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en medio buffer pH 7.4 con $I_m=0.15$ M, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura. (◇) Medio sin Eudragit® E-100 modificado. (o) Medio con Eudragit® E-100 modificado.

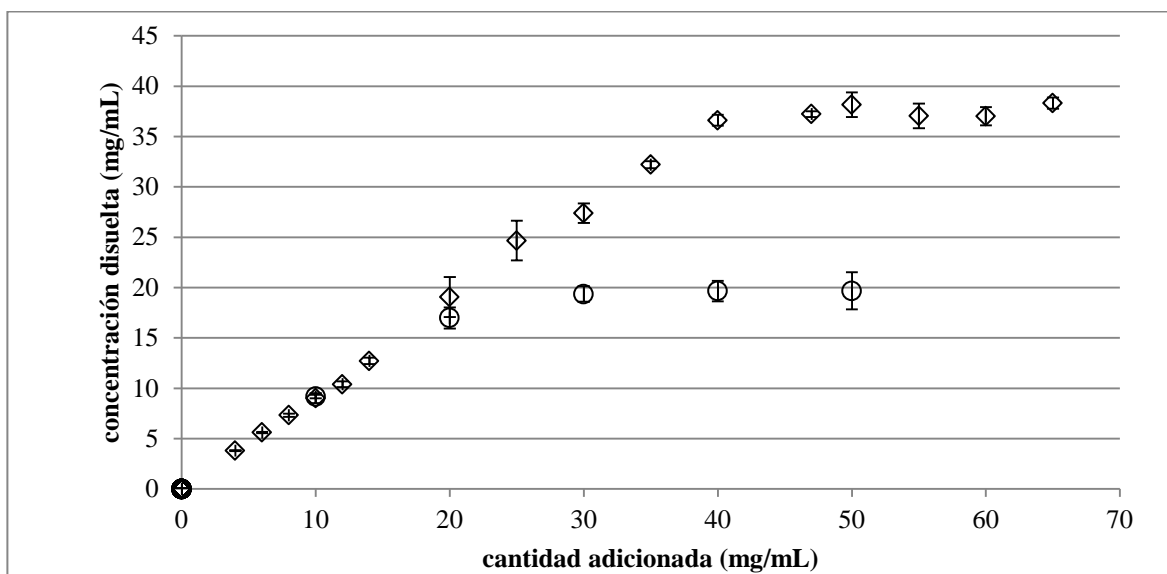


Figura 14. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en medio buffer pH 1.2 con $I_m=0.15$ M, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura. (◇) Medio sin Eudragit® E-100 modificado. (o) Medio con Eudragit® E-100 modificado.

A partir de las figuras 14 y 15, se puede observar una variación en los perfiles de saturación de la fase líquida del medio por parte de la ampicilina trihidratada.

Cuando se emplea el material polimérico cloruro de Eudragit® E-100 modificado en ambas condiciones de pH, siendo más marcada la variación del perfil a un valor de pH de 1.2, que a un valor de pH de 7.4 donde el cambio es moderado. Con el ánimo de establecer si las diferencias observadas en estos perfiles de saturación son estadísticamente significativas, se resumen en la tabla 1 los datos de la cantidad de ampicilina disuelta en cada medio biorrelevante realizado en cada ensayo.

Tabla 1. Cantidad de ampicilina trihidratada disuelta en medios biorrelevantes, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37°C de temperatura.

Sistema o Medio biorrelevante	Solubilidad intrínseca de ampicilina trihidratada			Promedio(mg/mL)	Desviación estándar
	(S _o .1) (mg/mL)	(S _o .2) (mg/mL)	(S _o .3) (mg/mL)		
H ₂ O	6,8	7,4	6,3	6,9	0,6
Solución buffer pH:1.2	36,1	32,8	37,0	35,3	2,2
Solución buffer pH:1.2 + Eudragit E-100 modificado	21,5	17,4	17,6	18,8	2,3
Solución buffer pH: 7.4	12,8	13,8	13,6	13,4	0,5
Solución buffer pH: 7.4+ Eudragit E-100 modificado	11,5	10,4	11,5	11,1	0,6

El análisis de varianza realizado (anexo 3), demostró que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para la solubilidad intrínseca de la ampicilina trihidratada en cada medio biorrelevante evaluado, dependiendo tanto del pH como de la presencia del material polimérico en el sistema. En este contexto, se puede observar que los máximos valores de S_o para la ampicilina se

dan cuando se utiliza el medio buffer a pH 1.2, mientras que con el medio biorrelevante con valores de pH de 7.4 los valores de saturación de fase S_0 son menores. Se aprecia además que cuando en el medio biorrelevante se encuentra el material polimérico, existe una disminución en los valores de la cantidad de ampicilina trihidratada disuelta. Como se discutió anteriormente, la solubilidad de la ampicilina se encuentra fuertemente condicionada por su estructura química y en consecuencia por sus valores de pKa, así como por el pH del medio. Por otro lado, la disminución de la cantidad de ampicilina disuelta cuando se encuentra el material polimérico resulta muy interesante, dado que se esperaría que dicho sistemas polimérico se autorganizará en medio acuoso generando un pseudofase hidrófoba en virtud de sus grupos funcionales apolares, con lo cual se produjera una diferencia de potenciales químicos entre el medio acuoso y la pseudofase polimérica, de manera tal, que la ampicilina migrara en forma espontánea hacia dicha fase incrementando su solubilidad en el sistema de mezcla, tal y como se ha observado para un gran variedad de compuestos orgánicos. No obstante, hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron solo por un tiempo de 30 minutos, debido que si se excedía un tiempo mayor a este la ampicilina comienza a degradarse, lo cual se corroboró con ensayos preliminares (ver anexo 5). Teniendo en cuenta esto último y que habitualmente el tiempo que se demora un proceso de saturación de fase a las mismas condiciones, puede ir de horas a días; entonces muy posiblemente podríamos estar frente a un efecto de disminución en la velocidad de disolución y no necesariamente de la solubilidad de la ampicilina.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró formar el sistema Ionomérico clorohidrato de Eudragit®E-100, sin embargo se observa que en el proceso de obtención, también ocurre hidrólisis de los grupos esteres, con lo cual se pierden fracciones de grupos funcionales que le dan la característica de anfifilicidad al sistema ionomérico formado.
2. La metodología utilizada para la cuantificación de la ampicilina trihidratada es muy confiable y reproducible, por lo que en futuras investigaciones de esta línea de trabajo.
3. Los resultados de los perfiles de solubilidad mostraron diferencias significativas tanto en los medios biorrelevantes como en la utilización del polímero. Con esto se puede concluir que la ampicilina trihidratada es mucho más soluble en un medio de pH ácido (1,2), pero esta se vio significativamente disminuida al asociarla con el polímero, sin embargo esta sigue siendo mayor a su solubilidad intrínseca en un medio a pH 7,4. En este medio neutro la presencia del polímero no disminuye significativamente la solubilidad de la ampicilina trihidratada.

10.RECOMENDACIONES

En relación al proceso de formación del sistema Ionomérico obtenido a partir del Eudragit E-100, es necesario evaluar otras metodologías con medios ácidos débiles, que conlleven a una menor hidrólisis de los grupos ésteres del sistema polimérico precursor.

Por otro lado, se recomienda realizar este mismo estudio en diferentes proporciones fármaco:polímero, así como a diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura con el fin de caracterizar adecuadamente el fenómeno de asociación, dado entre el ionómero del Eudragit E-100 y la ampicilina trihidratada.

11. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos profundamente a nuestro tutor, el Dr. Constain Salamanca por el acogimiento desde 6to semestre en su grupo de investigación y por su apoyo incondicional en todo el proceso de desarrollo de este proyecto de grado. También agradecemos a todos los profesores que nos acompañaron en este proceso de formación no solo académica y profesional sino también personal, desde los primeros semestres hasta ahora.

Agradecemos también a nuestros familiares y amigos por el tiempo, la paciencia y el amor que nos han brindado lo largo de nuestras vidas.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abuin, E. B. and Scaiano, J. C., *J.Am.Chem.Soc.*, 1984, 106, 6274-6276.

Allen, C., Maysinger, D., and Eisenberg, A., *Colloids Surf.B: Biointerf.*, 1999, 16, 3-27.

Allen, C., Yu, Y. S., Maysinger, D., and Eisenberg, A., *Bioconjugate Chemistry*, 1998, 9, 564-572.

Bacu, E., et al., A., *Eur.Polym.J.*, 2002, 38, 1509-1513.

Baena, Yolima. "Estudio fisicoquímico de la liberación del diclofenac a partir de complejos polielectrolito-fármaco". tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Santa Fe de Bogotá. 2011.

Barraza, R. G. and Ríos, H. E., *J.Coll.Interf.Sc.*, 1999, 209, 261-263.

Bonferoni, M. C., S. Rossi, S, Ferrari F, Bettinetti GP, Caramella C. (2000). "Characterization of a diltiazem-lambda carrageenan complex." *Int J PharmSci*200(2): 207-16.

Chitanu, G. C., et al., *Polymer Degradation And Stability*, 1999, 65, 75-85.

Cordiés Jackson L, Machado Reyes LA, Hamilton Cordiés ML. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Med* 1998;8(1):13-27.

Drugbank, Ampicillin, recuperado de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00415>, el día 1 de Octubre de 2013.

Dubin, P. L. and Strauss, U. P., *J.Phys.Chem.*, 1970, 74, 2842-2847.

Eudragit® An Evonik product, EUDRAGIT E 100, EUDRAGIT E PO and EUDRAGIT E 12,5, technical information.

Eudragit® An Evonik product, EUDRAGIT E 100, EUDRAGIT E PO and EUDRAGIT E 12,5, Specifications and test methods.

Eudragit® An Evonik product, EUDRAGIT RL 100, EUDRAGIT RL PO, EUDRAGIT RS 100 and EUDRAGIT RS PO, technical information.

Evonik Industries. Eudragit® Polímeros Acrílicos para Formas Farmacéuticas Sólidas Orales.

Farmacopea de los Estados Unidos 35/ NF 30, vol 1, monografías oficiales, Copolimero de Amino Metacrilato, pag 1878.

Fernandez F, López J. Resistencia Bacteriana. *Rev Cubana Med Milit* 2003;32.

García P. Resistencia Bacteriana en Chile. *Rev Chil Infect* 2003; 20 (Supl 1): S11 - S23.

García Rodríguez JA, García Sánchez E. (1997). Resistencias bacterianas y antibioterapia. En: *Eficacia in vivo Eficacia in vitro*. Madrid-Barcelona: edDoyma, S.A. 39-50.

Glass, J. E. "Polymers in Aqueous Media: Performance Through Association", *American Chemical Society*, Washington, DC, 1989.

Goddard, E. D. and Ananthapadmanabhan, K. P., "Interactions of surfactants with polymers and proteins", *CRC Press, Boca Raton*, 1993.

Gómez-Lus R, Gil J, Castillo J, Rubio MC. (1992) Impacto de los inhibidores de beta-lactamasas en la susceptibilidad antibiótica de los patógenos más frecuentes. En: *Betalactamasas: su importancia para el clínico*. Madrid: Smith Kline&French S.A.E. 109-127.

Graham, H. D., Y. M. Baker, Njoku-ob AN. (1963). "Complex formation between hydrocollids and tranquilizers and hypotensive agents." *J. Pharm. Sci* 52(2): 192-198.

Hansson, P. and Lindman, B., *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 1996, 1, 604-613.

Jablon, P. A., G. S. Banker, Smolen VF. (1970). "In vitro and in vivo chlorpromazine availability from flocculated polysalt complex systems." *J PharmSci* 59(8): 1143-9.

Jiménez, F.; Mora, C.; Luengas, P. (1994). Determinación de la solubilidad en función del tiempo de equilibrio y solubilidad estándar para algunas muestras de Metronidazol. *Revista Colombiana de ciencias Químico-Farmacéuticas*, 22, 13-20.

Jimenez-Kairuz, A., D. Allemandi, Manzo RH (2002). "Mechanism of lidocaine release from carbomer-lidocaine hydrogels." *J PharmSci* 91(1): 267-72.

- Jung, J. Y., Yoo, S. D., Lee, S. H., Kim, K. H., Yoon, D. S., & Lee, K. H. (1999). Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique. *International journal of pharmaceutics*, 187(2), 209-218.
- Kabanov, A. V. and Alakhov, V. Y., *Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.*, 2002, 19, 1-72.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Miller, D. W., *Adv.DrugDeliv.Rev.*, 2003, 55, 151-164.
- Khalil, E. and A. Sallam (1999). "Interaction of two diclofenac acid salts with copolymers of ammoniomethacrylate: effect of additives and release profiles." *DrugDevIndPharm* 25(4): 419-27.
- Lasic, D. D., *Nature*, 1992, 355, 279-280.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., and Kwon, G. S., *Adv.DrugDeliv.Rev.*, 2002, 54, 169-190.
- Lavasanifar, A., Samuel, J., Sattari, S., and Kwon, G. S., *Pharmaceutical Research*, 2002, 19, 418- 422.
- Lindman, B. and Thalberg, K., "Polymer-surfactant interactions - Recent developments", in *Interactions of surfactants with polymers and proteins*, CRC Press, Boca Raton 1993.
- Liu, C., Chang, T., Wu, S., & Chiang, H. (2006). Total solubility determination of mixtures containing ampicillin anhydrate and ampicillin trihydrate. *Journal-Chinese Chemical Society Taipei*, 53(4), 851.
- Livermore DM, Brown DFJ. (2001) Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J AntimicrobChemother.* Jul 1;48 (suppl 1):59-64.
- Marovac, J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista médica de Chile*, 129(1), 99-106.
- Miller, D. W. and Kabanov, A. V., *Colloids Surf.B: Biointerf.*, 1999, 16, 321-330.
- Mora C., Validación de una metodología analítica para la cuantificación de naproxeno en estudios de reparto líquido/líquido mediante espectrofotometría ultravioleta. 2006, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 35, 81-185.
- Moustafine, R. I., Zaharov, I. M., & Kemenova, V. A. (2006). Physicochemical characterization and drug release properties of Eudragit® E PO/Eudragit® L

100-55 interpolyelectrolyte complexes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 63(1), 26-36.

Olea, A. F. and Thomas, J. K., *Macromolecules*, 1989, 22, 1165-1169.

Olea, A. F., Barraza, R. G., Fuentes, I., Acevedo, B., and Martinez, F., *Macromolecules*, 2002, 35, 1049-1053.

Pérez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter SistNac Salud*, 22, 57-67.

Perozo-Mena, A., Castellano-González, M., Ginestre-Pérez, M., & Harris, B. (2007). Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en las Unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. (Spanish). *Revista Kasma*, 35(2), 91-106.

Quinteros, D. A., V. R. Rigo, Kairuz AF, Olivera ME, Manzo RH, Allemandi DA. (2008). "Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs." *Eur J PharmSci* 33(1): 72-9.

Rang y Dale. *Farmacología*, Sexta edición. Editorial Elsevier. Barcelona, España, 2008. pp. 646-660.

Salamanca C. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN A SISTEMAS MICROHETEROGÉNEOS FORMADOS POR POLIELECTRÓLITOS.

Salamanca C. Diseño de una forma farmacéutica de ampicilina, útil frente microorganismos productores de beta-lactamasas. Ficha técnica de proyectos. Grupo de investigación Natura, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Icesi, Marzo de 2011.

Salvage, J. P., et al., *Journal Of Controlled Release*, 2003, 87, 230-233.

SANTOS B.; GUERRERO M. D.; *Administración de medicamentos, teoría y práctica*; Madrid; 1994; pag. 205.

Shargel, L.; Yu, A. (1999). *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*; Appleton & Lange: Stamford; Chapter 6.

Somasanduran, P. and Lee, L. T., *Sep.Sci.Technol.*, 1981, 16, 1475.

Thomas, J. K., "Chemistry of Excitation at Interfaces", *American Chemical Society*, Washington, DC.1983.

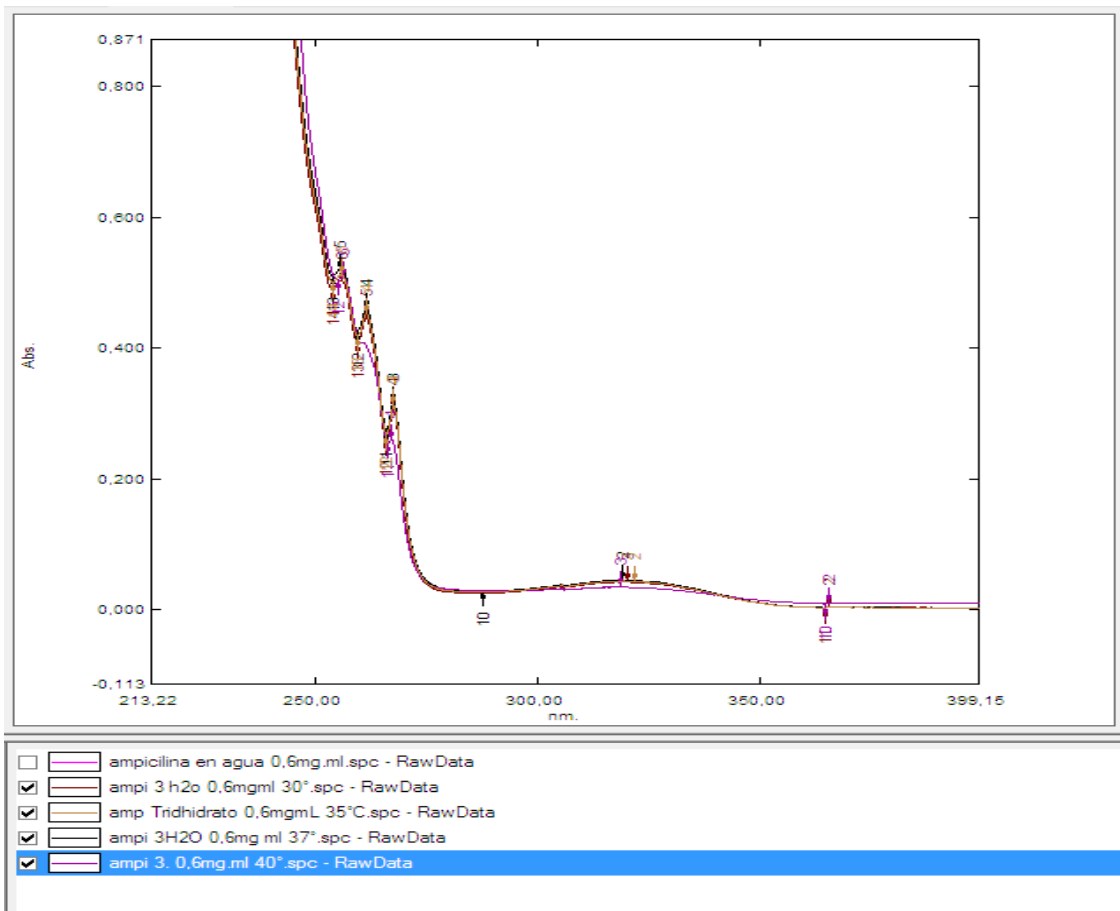
Trivedi, B. C. and Culbertson, B. M., "Maleic Anhydride", *Plenum Press*, New York 1982.

Vilches, A. P., A. Jimenez-Kairuz, Alovero F, Olivera ME, Allemandi DA, Manzo RH. (2002). "Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels." *Int J Pharm* 246(1-2): 17-24.

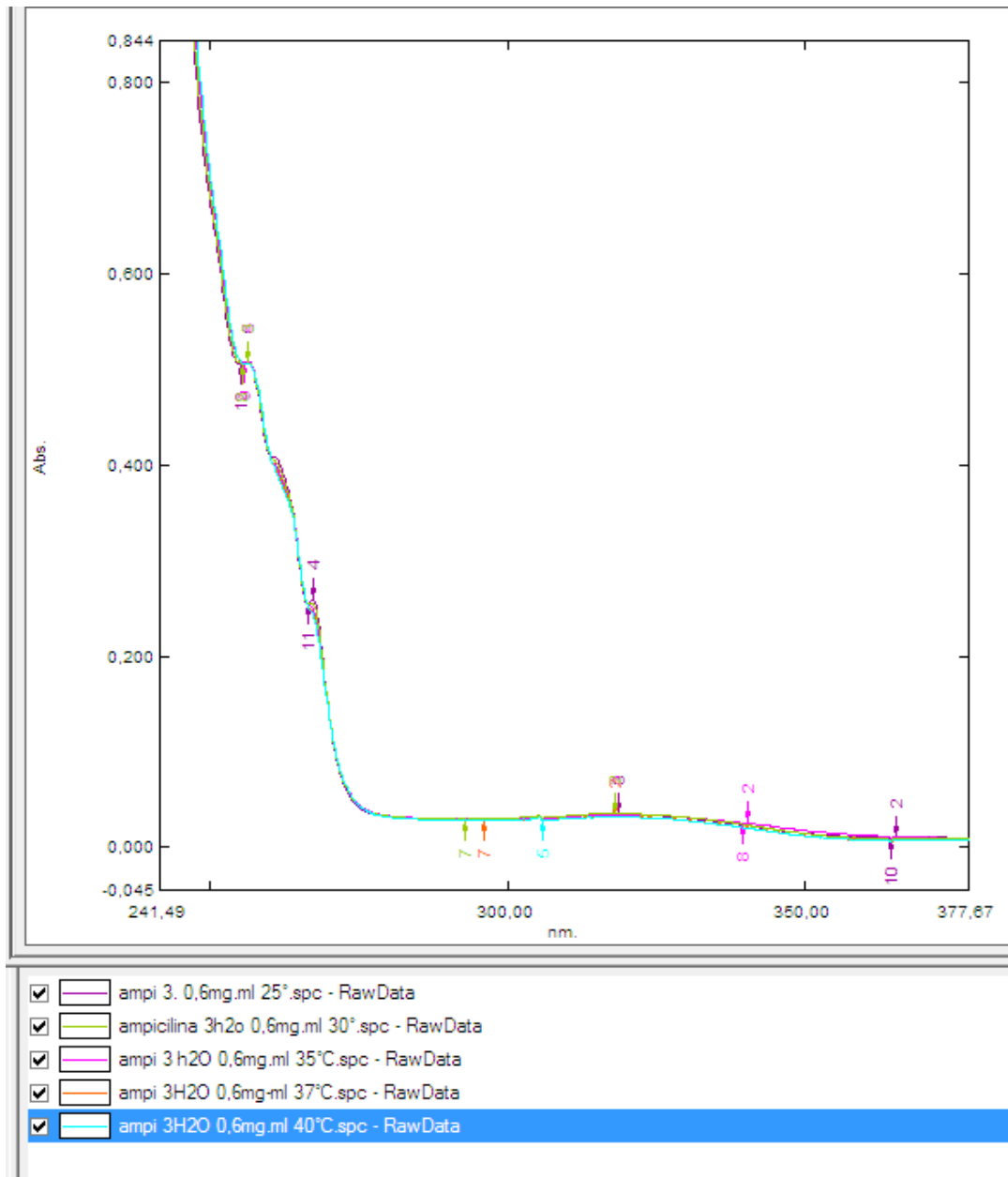
ANEXO 1. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

SELECTIVIDAD

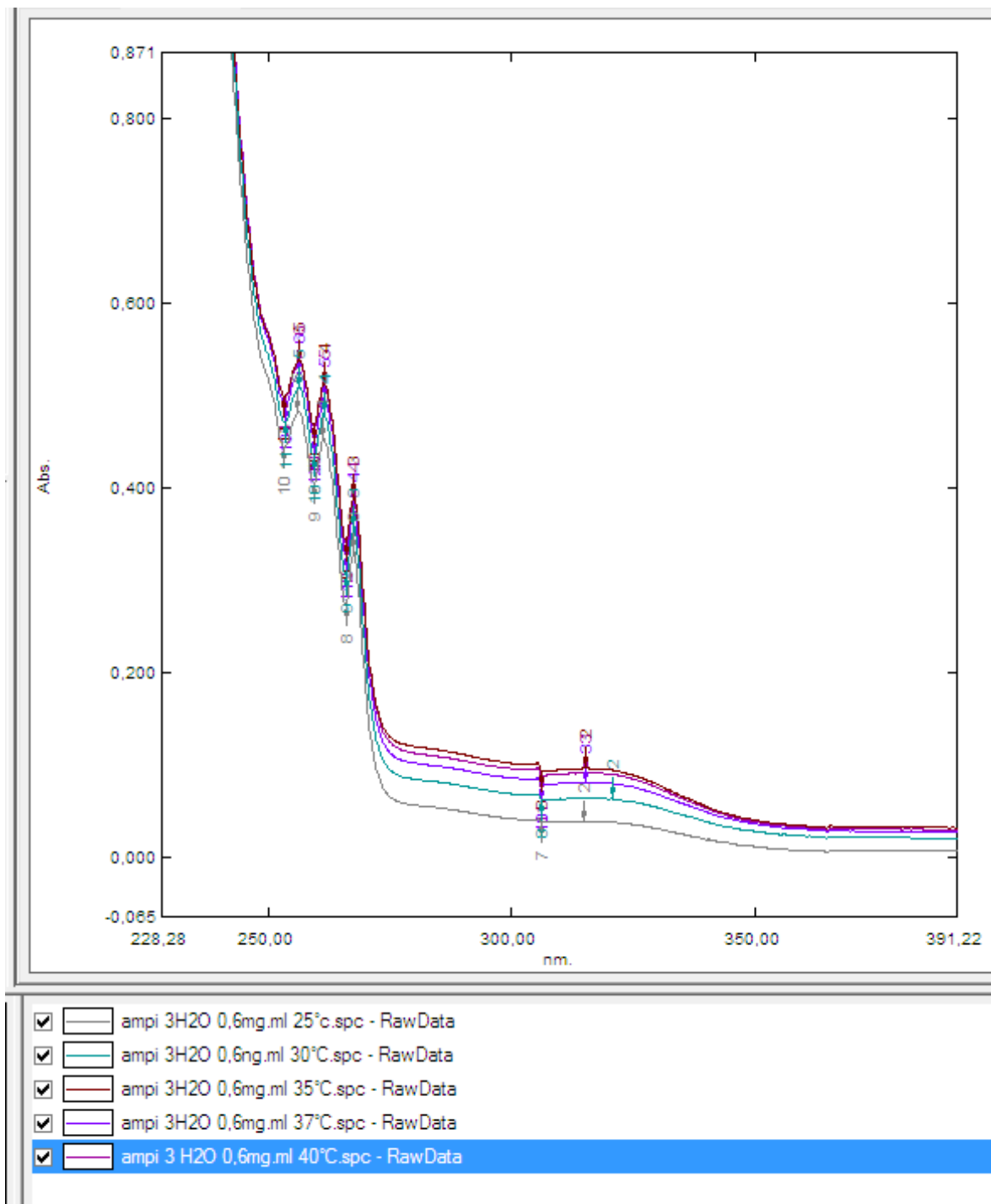
Se prepararon soluciones de ampicilina trihidratada a concentraciones de 0.6 mg/ml en cada uno de los tres medios (agua, buffer fosfato pH 7.4 y buffer pH 1.2). Posteriormente se realizaron barridos entre 400 y 200 nm a cinco diferentes temperaturas: 25, 30, 35, 37 y 40°C, utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1800 con una termocupla acoplada, para determinar la longitud de onda de óptima absorción. Los espectros obtenidos se presentan en la figura 16:



(a)



(b)



(c)

Figura 15. . Barridos ampicilina trihidratada en a) agua, b) buffer pH 7,4, c) buffer pH 1,2 a 25, 30, 35, 37 y 40°C.

Con estos barridos, se escogió una longitud de onda de 264 nm para determinar los demás parámetros de validación (repetibilidad y linealidad) y realizar los estudios de solubilidad. A esta longitud de onda se observa un pico muy definido que se mantiene con la variación de la concentración y de pH.

REPETIBILIDAD

REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

Se prepararon soluciones de ampicilina trihidratada a concentraciones de 0.6 mg/ml utilizando como medio agua, buffer fosfato pH 7.4 y buffer clorhídrico pH 1.2. Cada muestra se leyó 10 veces a 256nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu® a una temperatura de 37°C. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 2. Datos repetibilidad del sistema en agua

REPETIBILIDAD Agua	
Número de repeticiones	Absorbancia
1	0.552
2	0.552
3	0.552
4	0.552
5	0.552
6	0.552
7	0.552
8	0.552
9	0.552
10	0.552
Promedio	0.552
Desviación Estándar	1.17E-16
%CV	2.12E-14
Temperatura in situ	37.3°C

Tabla 3. Datos repetibilidad del sistema en buffer pH 7,4

REPETIBILIDAD Buffer pH 7,4	
Número de repeticiones	Absorbancia
1	0.437
2	0.437
3	0.437
4	0.437
5	0.437
6	0.437
7	0.437
8	0.437
9	0.437
10	0.437
Promedio	0.437
Desviación Estándar	5.85E-17
%CV	1.34E-14
Temperatura in situ	37.1°C

Tabla 4. Repetibilidad del sistema a pH 1,2

REPETIBILIDAD Buffer pH 1,2	
Número de repeticiones	Absorbancia
1	0.520
2	0.520
3	0.520
4	0.520
5	0.520
6	0.520
7	0.520
8	0.520
9	0.520
10	0.520
Promedio	0.520
Desviación Estándar	1.17E-16
%CV	2.25E-14
Temperatura in situ	37.1°C

Para simplificar la lectura de resultados, a continuación se presentan los promedios en la tabla 5:

Tabla 5: Resultados de repetibilidad del sistema en los tres medios

Condición	Promedio absorbancias	Desviación estándar	%CV	Temperatura in situ (°C)
Agua	0.552	1.17E-16	2.12E-14	37,3
pH 7,4	0.437	5.85E-17	1.34E-14	37.1
pH 1,2	0.520	1.17E-16	2.25E-14	37.1

Estos resultados nos demuestran que el equipo está funcionando correctamente y que sus resultados van a ser confiables.

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se prepararon 6 soluciones de ampicilina trihidratada a 6mg/mL en tres diferentes medios: agua, buffer fosfato pH 7,4 y buffer clorhídrico a pH 1,2. Se leyó cada muestra a 256 nm utilizando un espectrofotómetro UV marca Shimadzu® a una temperatura de 37°C.

Tabla 6: Repetibilidad del método en agua

Medio: Agua			
Medida	Concentración real	Absorbancia	Absorbancia corregida
1	0.58	0.570	0.590
2	0.58	0.556	0.575
3	0.60	0.583	0.583
4	0.60	0.573	0.573
5	0.60	0.570	0.570
6	0.58	0.560	0.579
Promedio	0.590	0.569	0.578
DesvEst	0.011	0.010	0.007
%CV	1.857	1.693	1.244

Tabla 7: Repetibilidad del método a pH 7,4

Medio: Buffer pH 7,4			
Medida	Concentración real	Absorbancia	Absorbancia corregida
1	0.60	0.450	0.450
2	0.56	0.435	0.466
3	0.60	0.460	0.460
4	0.60	0.455	0.455
5	0.60	0.446	0.446
6	0.62	0.466	0.451
Promedio	0.597	0.452	0.455
DesvEst	0.020	0.011	0.007
%CV	3.296	2.420	1.614

Tabla 8. Repetibilidad del método a pH 1,2

Medio: Buffer pH 1,2			
Medida	Concentración real	Absorbancia	Absorbancia corregida
1	0.58	0.480	0.497
2	0.60	0.503	0.503
3	0.62	0.522	0.505
4	0.62	0.530	0.513
5	0.58	0.470	0.486
6	0.60	0.502	0.502
Promedio	0.600	0.501	0.501
DesvEst	0.018	0.023	0.009
%CV	2.981	4.627	1.791

Para facilitar la lectura de los resultados, los datos promedios se presentan en la tabla 9:

Tabla 9: Resultados de la Repetibilidad del método en los tres medios

Condición	Agua	pH 7,4	pH 1,2
Promedio concentración	0.590	0.597	0.600
Desviación estándar concentración	0.011	0.020	0.018
%CV concentración	1.857	3.296	2.981
Promedio absorbancia corregida	0.578	0.455	0.501
Desviación estándar absorbancia	0.007	0.007	0.009
%CV absorbancia	1.244	1.614	1.791

Estos resultados nos demuestran que la metodología establecida es reproducible en el laboratorio y que los resultados obtenidos mediante esta van a ser confiables.

LINEALIDAD

Para realizar las curvas de calibración se pesaron 25 mg de ampicilina trihidratada y se llevaron a un balón volumétrico de 25 ml. Se aforó con solución de buffer fosfatos mono y dibásicos de potasio pH 7.4. De esta solución se prepararon las diluciones a 0.7 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.3 mg/ml y 0.1 mg/ml. Posteriormente se realizaron 3 mediciones de absorbancia a cada muestra y concentración establecida para determinar la repetitividad, midiendo que la temperatura in situ estuviera a 37°C.

Este procedimiento se realizó por triplicado en 3 días diferentes y con analistas diferentes para determinar la precisión intermedia. Se realizó el mismo procedimiento con el buffer de ácido clorhídrico a pH 1.2 y en agua. Finalmente se analizaron los parámetros de validación evaluados. Las ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas, con el coeficiente de desviación estándar (R^2) se muestran a en la tabla 10.

Tabla 10: Ecuaciones de las Curvas de Calibración a las tres condiciones evaluadas.

Condición	Pendiente	Intercepto	R ²
Agua a 37°C	0,842	0,004	0,999
pH 7,4 a 37°C	0,747	0,015	0,999
pH 1,2 a 37°C	0,831	0,017	1,000

Las curvas de calibración se muestran en las figuras 17, 18 y 19:

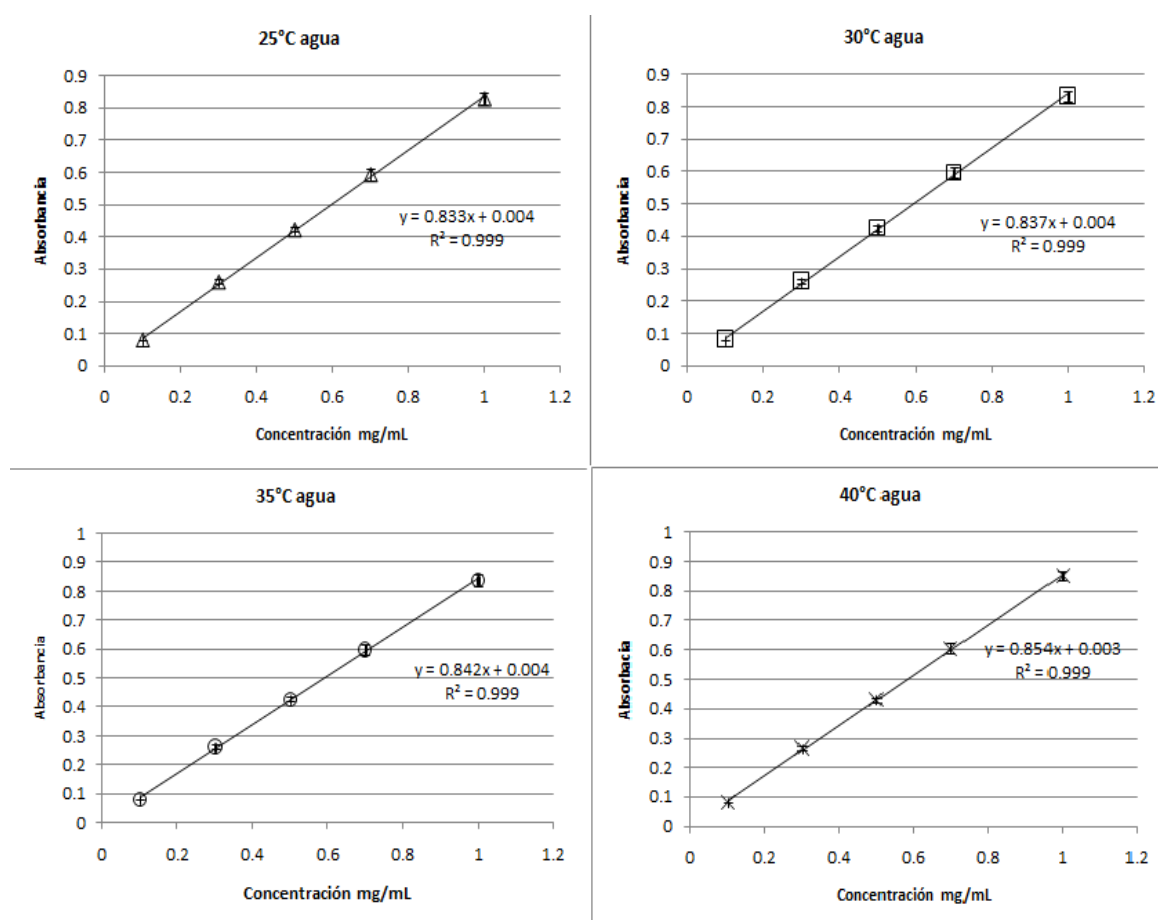


Figura 16. Curvas de Calibración en agua a las 4 temperaturas estudiadas.

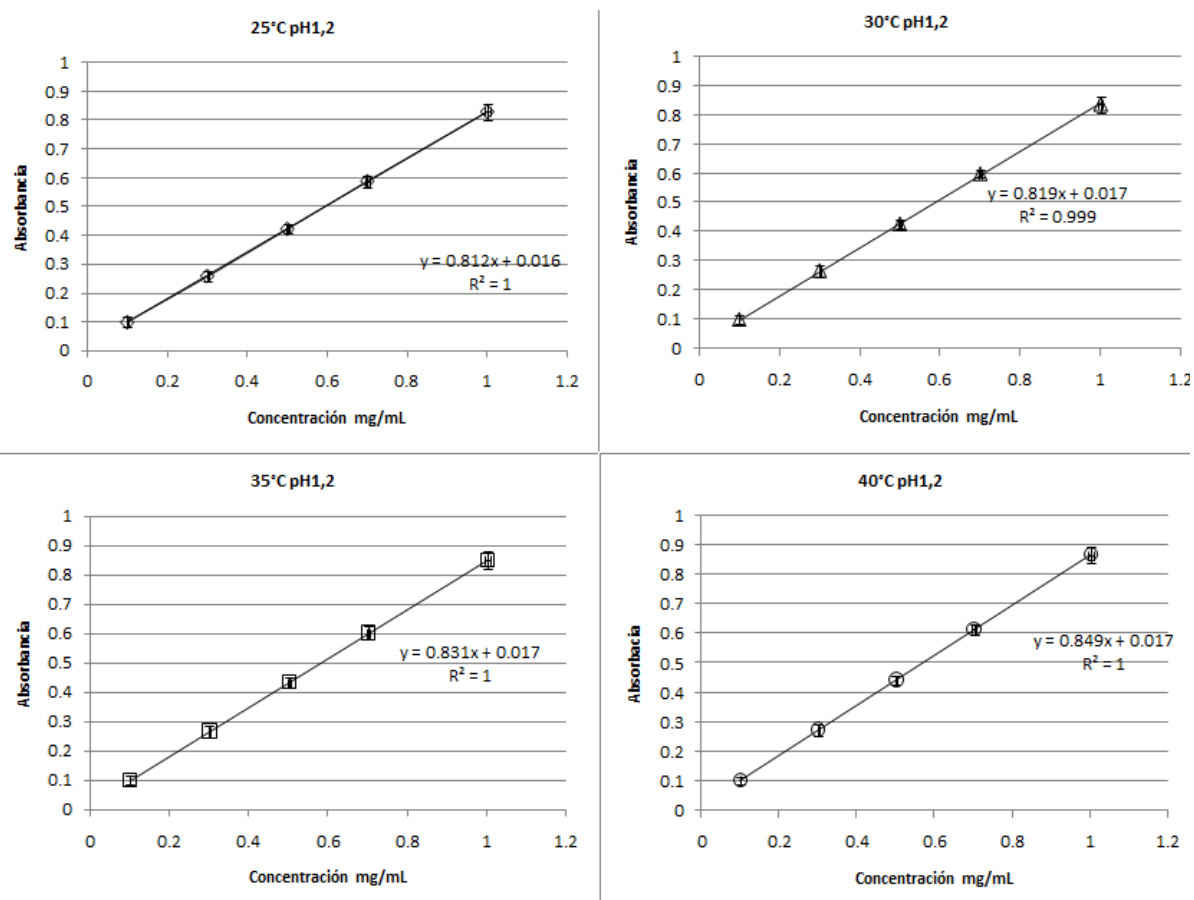


Figura 17. Curvas de Calibración en buffer pH 1,2 a las 4 temperaturas estudiadas.

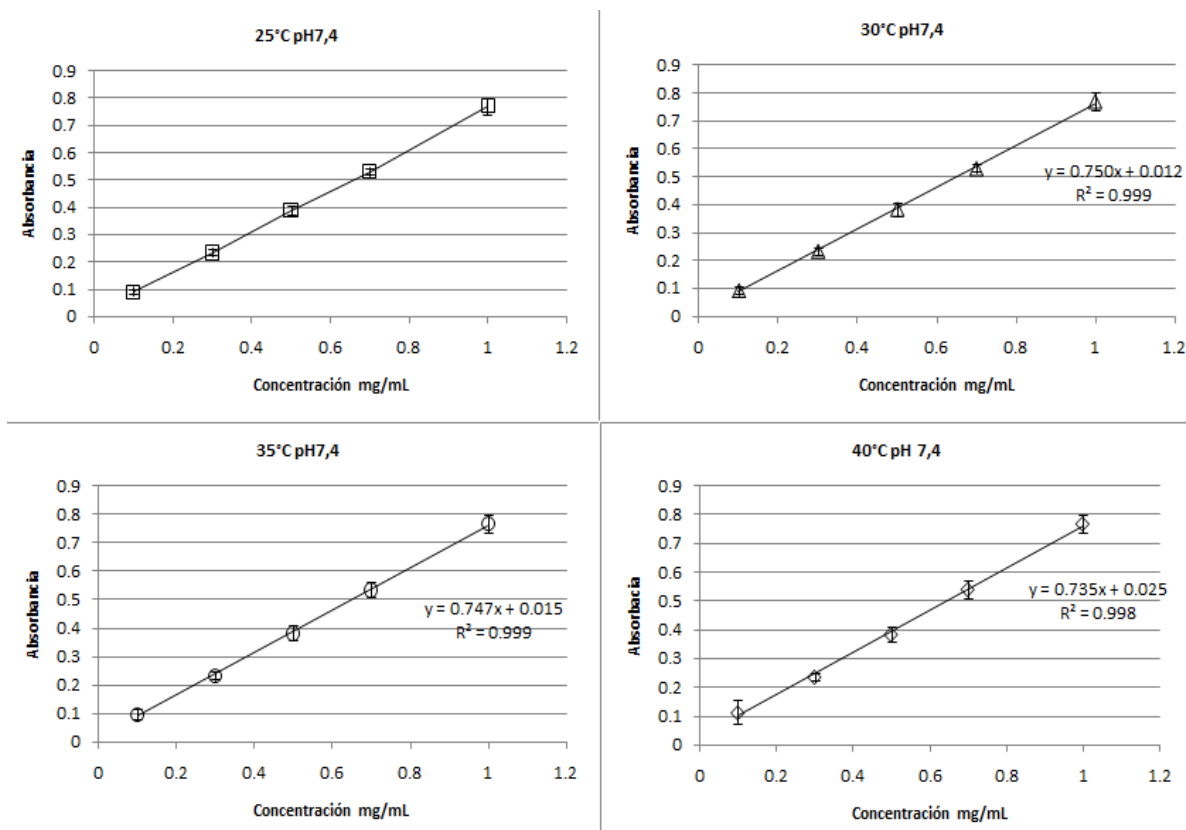


Figura 18. Curvas de Calibración en buffer pH 7,4 a las 4 temperaturas estudiadas.

Estos resultados demuestran que la metodología es reproducible, tiene un comportamiento lineal y es precisa, con lo que se obtiene la certeza de que los resultados que se obtengan serán confiables.

ANEXO 2. ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LOS ESTUDIOS DE SOLUBILIDAD

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIPO DE AGITACIÓN EN EL PROCESO DE SATURACIÓN DE FASE LÍQUIDA (AGITACIÓN ANGULAR, AGITACIÓN ORBITAL Y AGITACIÓN MAGNÉTICA)

Inicialmente se realizó el ensayo utilizando un equipo tipo Carrusel (agitación angular), el cual tenía un baño de agua que mantenía la temperatura de los viales en 37°C. Para esto se verificó la hermeticidad de los viales, por lo que se llenaron con 10 mL de una solución acuosa de azul de metileno. Posteriormente se sellaron con parafilm y después se les puso la tapa, como se muestra en la figura 20.



Figura 19. Sellado de cada vial para el agitador angular con parafilm.

Se puso en funcionamiento el equipo por 10 minutos a 90 RPM. Finalizado el tiempo se sacó cada vial y se midió el volumen con una pipeta graduada verificando que este se conservara en 10 mL. Los viales que presentaron una disminución del volumen fueron descartados. Además se colocó atención a la coloración del agua del baño termostatado. Para realizar el estudio, se prepararon soluciones de ampicilina trihidratada en agua desde 2 mg/ml hasta 20 mg/ml en un volumen de 5 mL, se ajustó el equipo a 37°C y se puso en funcionamiento durante 30 min. Se realizaron las diluciones respectivas, para lo cual se tomó la muestra de los viales y se filtró. Se leyeron las muestras en el espectrofotómetro UV marca Shimadzu®. Para cada concentración se realizaron 3 repeticiones.

Además se realizó el mismo estudio utilizando el agitador Shaker (incubadora) el cual tiene una agitación orbitalaria.

Finalmente se realizó el mismo procedimiento utilizando una plancha de calentamiento y agitación múltiple (con 12 puestos). Para este caso se tuvo un control estricto de la temperatura in situ en cada erlenmeyer. Se realizaron las diluciones respectivas, para lo cual se tomó la muestra de los erlenmeyers y se

filtró. Se leyeron las muestras en el espectrofotómetro UV marca Shimadzu® a 256nm. Para cada concentración se pesaron 3 muestras.

En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos.

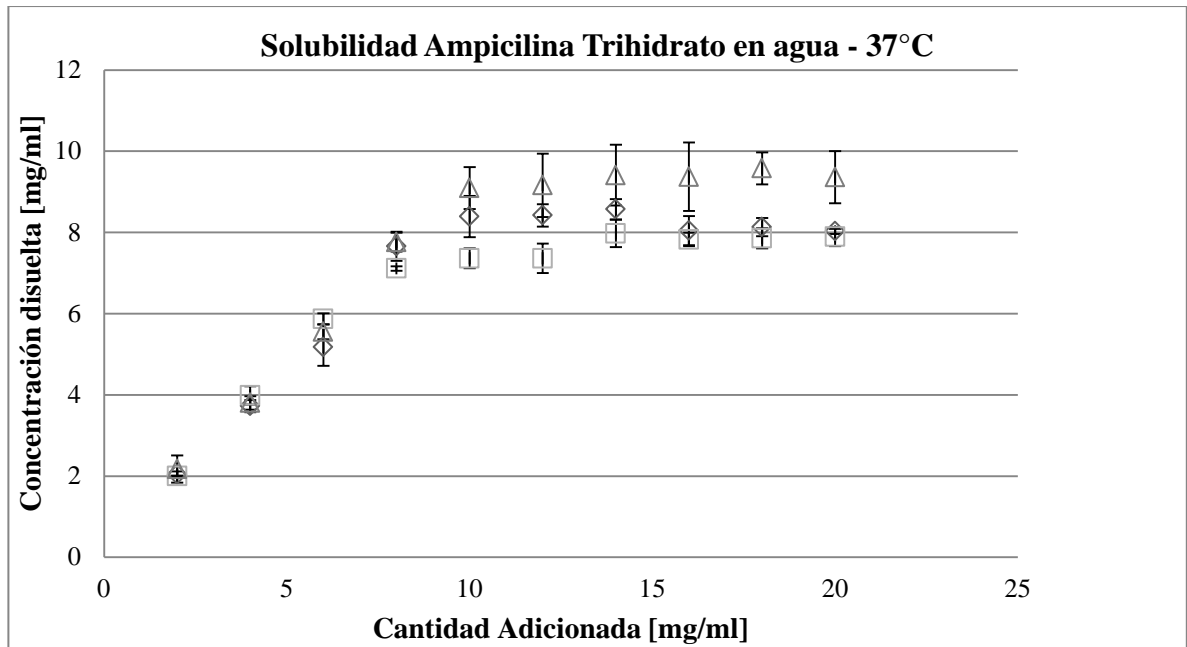


Figura 20. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en agua a 37°C, utilizando los equipos de agitación orbital (□), agitación magnética (Δ) y agitación radial (◇).

Como se observa en la figura 21, la metodología que presentó una mejor saturación del sistema fue la de agitación magnética, sin embargo, fue la que tenía mayor variabilidad entre las muestras. Se decidió realizar los estudios siguientes con el equipo incubadora Shaker (agitación orbital) dado que tenía una muy buena reproducibilidad y que permitía hacer un mayor número de muestras simultáneamente.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA SATURACIÓN DE FASE LÍQUIDA MEDIANTE UTILIZACIÓN DE AGITACIÓN ORBITAL

Después de determinar que la Incubadora Shaker era el mejor equipo para el estudio, se procedió a evaluar el efecto de la velocidad en la saturación. Para lo cual, se repitió el procedimiento anterior a tres diferentes velocidades: 200 RPM, 350RPM y 500RPM.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 22:

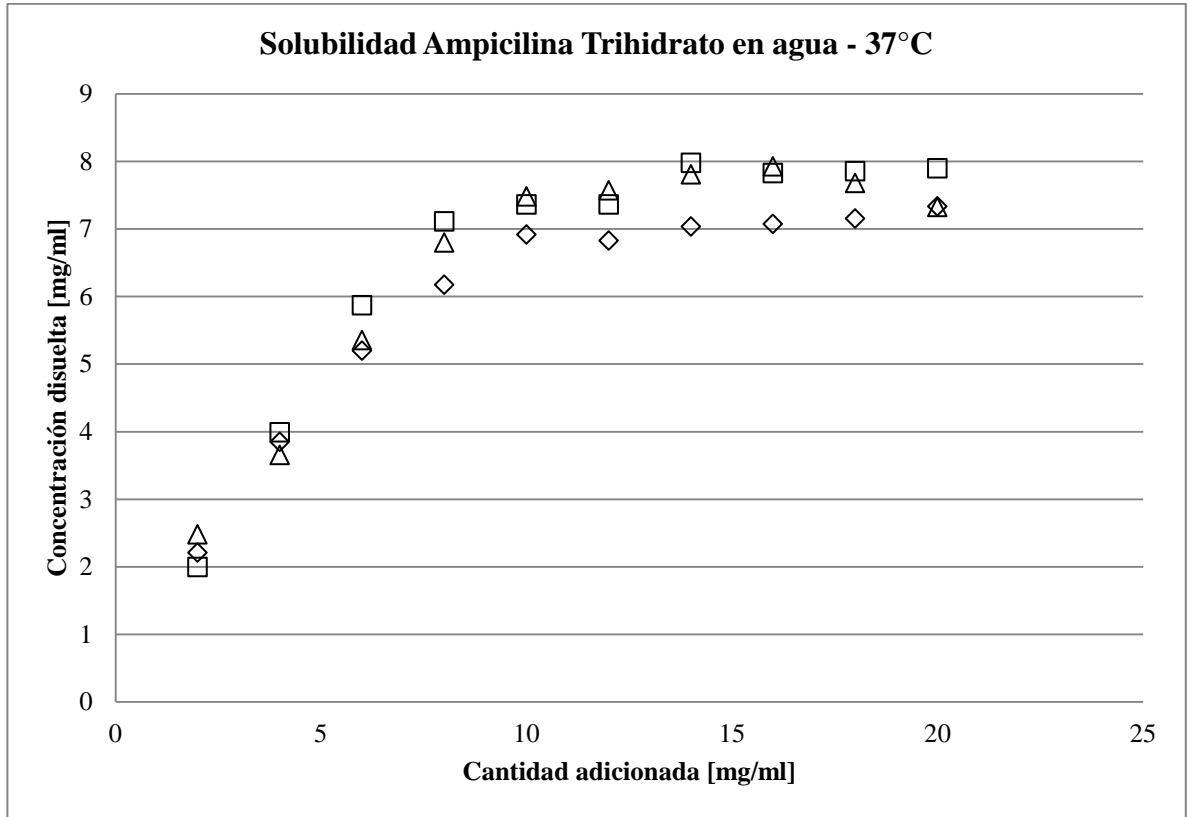


Figura 21. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en agua a 37°C utilizando el equipo de agitación orbital (Shaker) a 200 rpm (◇), 350 rpm (□) y 500 rpm (Δ).

Se puede observar en la gráfica que a 200 RPM hay una menor saturación de la interfase que a 350 y 500 RPM. Se decidió trabajar a 350 RPM dado que permitía tener una saturación de interfase estable y al no someter la muestra a tanto estrés, se evitaba que se degradara tan rápidamente.

ANEXO 3. PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados correspondientes al análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, determinadas a partir del modelo de la tabla 11.

Tabla 11. Resultados de los valores S_0 de los estudios de solubilidad.

Sistema	Valores de S_0 (mg/mL)	
	Medio Buffer pH 1,2	Medio Buffer pH 7,4
Con polímero	21.47	11.47
	17.42	10.35
	17.64	11.46
Sin polímero	36.12	12.81
	32.75	13.84
	36.96	13.58

Resultados del análisis de varianza:

Tabla 12. Resultados del Análisis de Varianza realizado a los valores S_0 de cada medio biorrelevante en presencia y ausencia del polímero.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Muestra	263,671875	1	263,671875	97,18472412	0,944206E-06
Columnas	657,8602083	1	657,8602083	242,4754739	2,88259E-07
Interacción	149,460283	1	149,460283	55,08835219	7,45991E-05
Dentro del grupo	21,7048	8	2,7131		
Total	1092,697092	11			

Los resultados calculados de F son mayores que los valores de F tabulados, indicando que existen diferencias significativas entre las solubilidades de la ampicilina trihidratada cuando se encuentran en los diferentes medio biorrelevantes y cuando se encuentran en presencia y ausencia del material polimérico.

ANEXO 4. ESTUDIOS PREVIOS

DETERMINACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE LA TEMPERATURA EN EL BAÑO TERMOSTATADO

Se registraron los valores de temperatura reportados por tres termómetros externos al baño y se compararon con la temperatura registrada por el termómetro del baño termostatado cada vez que se presentaba algún cambio en alguna de las temperaturas registradas por alguno de los termómetros. Se hizo girar el carrusel a una velocidad de 74 rpm, y se programó el equipo a una temperatura de 33,5°C con el fin de que la temperatura del baño reportada por los termómetros externos no bajara de 37,0°C, el objetivo era mantener la temperatura del baño alrededor de este último valor (entre 37,0°C y 37,5°C).

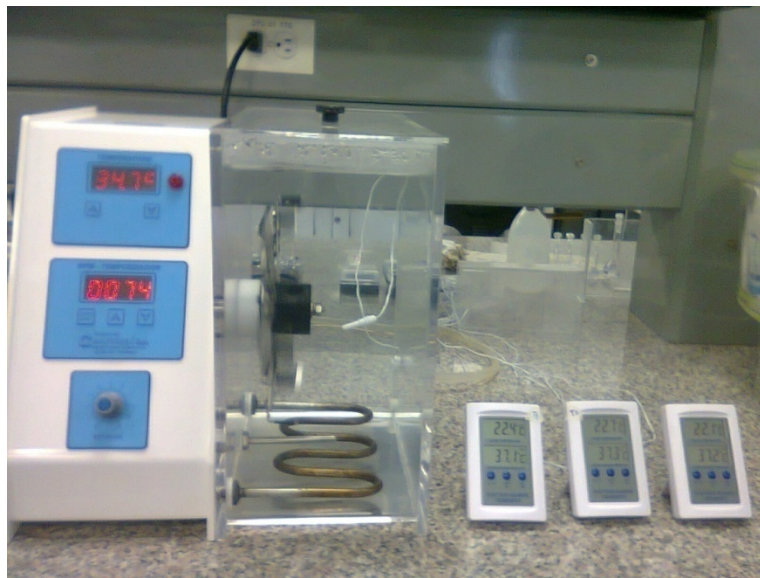


Figura 22. Ubicación de los termómetros en el baño y registro de las temperaturas de los cuatro termómetros

Tabla 13. Ubicación de los termómetros dentro del agitador termostato

Ubicación	Termómetro
Superficie	T1
Centro	T2
Fondo	T3
Reportada por el termostato	T4

Se observó que la temperatura que registraba el baño siempre era menor aproximadamente 3,0°C menos que la temperatura reportada por los otros tres termómetros.

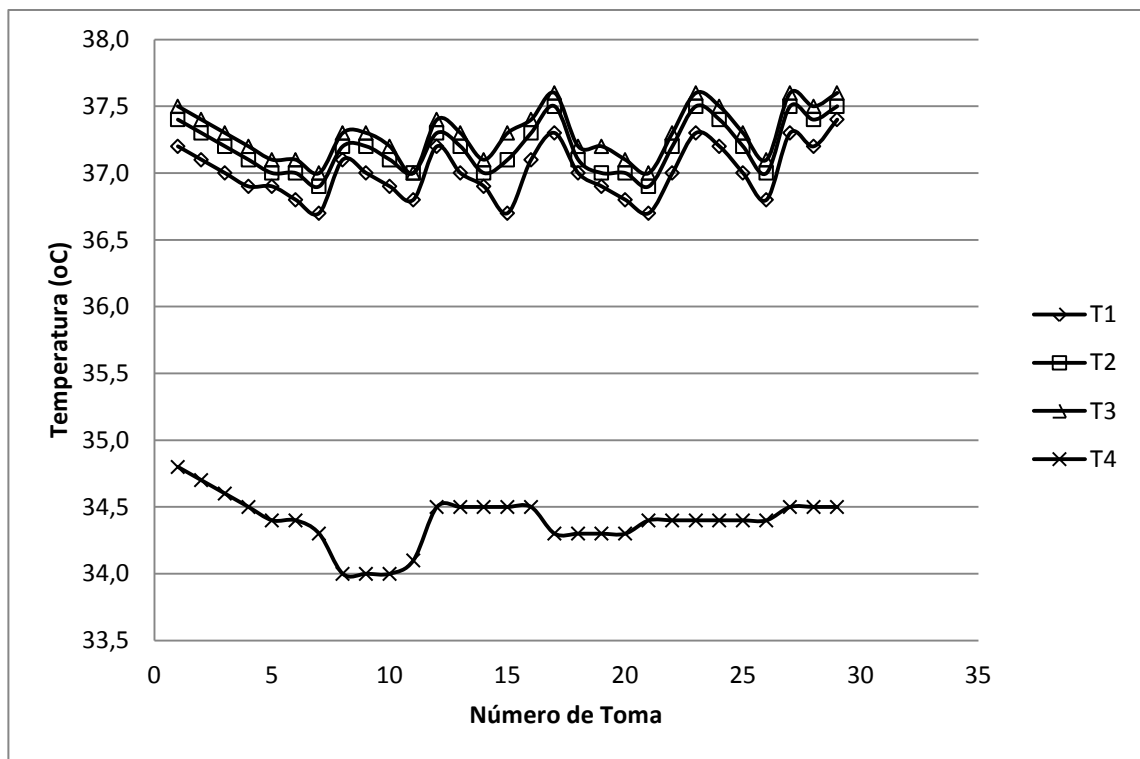


Figura 23: Comportamiento de la temperatura en diferentes puntos del baño termostatado del equipo carrusel (agitación radial).

VERIFICACIÓN DE LA HERMETICIDAD DE LOS TUBOS

Antes de proceder con los ensayos de solubilidad, se verificó que los tubos que se fueran a emplear para poner a girar en el carrusel del termostato, tuvieran una

capacidad volumétrica de 10mL y que no permitiesen escapar dicho volumen, cerrando los tubos con la tapa, sin otro refuerzo. Para ello, se tomaron 6 tubos debidamente marcados, se llenaron con 10mL de agua destilada, y se ubicaron en el carrusel del baño termostatado a 37°C, se hicieron girar a 74 rpm; y se midió el volumen de cada tubo cada 30 minutos por 90 minutos.

Es importante garantizar que en los tubos que se empleen durante los estudios de solubilidad no varíe el volumen de agua o de soluciones buffers a emplear, puesto que un cambio en el volumen del solvente en una solución, altera directamente el equilibrio soluto-solvente, saturando el sistema, y por lo tanto cambian los resultados del estudio. El que haya más volumen de solvente, puede ayudar a vencer las fuerzas soluto-soluto, y favorecer las interacciones soluto-solvente.

Previo a la adición de cada uno de los medios, se hizo la medición de fuerza iónica y pH para confirmar que estos parámetros tuvieran el valor especificado para el ensayo. El pH para el agua fue de 8,11 a una temperatura de 23,8°C; y una conductividad de 1 μ S/cm a una temperatura de 23,7°C. Los valores de pH para las soluciones buffer fueron: 1,25 y 7,39 para soluciones buffer pH 1,2 y 7,4; ambas medidas realizadas a una temperatura de 23,4°C.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DEL FÁRMACO

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE AMPICILINA SÓDICA

Se empleó para este ensayo, dos tubos con capacidad volumétrica de 4mL, en uno se adicionó 4mL de agua y en otro 4mL de solución buffer pH 7,4 ($\mu = 0,15M$) con el fin de determinar la concentración de ampicilina sódica de saturación en cada medio; y en ambos se agregó 40mg del antibiótico inicialmente. Se ubicaron los tubos en el carrusel del termostato a una temperatura de 35°C y se pusieron a girar a 100 rpm.

Cada vez que se observaba que el sistema llegaba a una fase (ampicilina sódica solubilizada en el medio correspondiente), se agregaba otros 40mg. Cuando se alcanzó una concentración de 120mg/mL (480mg en 4mL), se observó que la solución tomaba un color amarillento y se formaba una leve turbidez, sin embargo, se continuó adicionando el antibiótico hasta una concentración de 160mg/mL (640mg/mL) y no se observó algún signo de saturación del sistema.

En un segundo ensayo, se tomaron tres tubos con capacidad de 4mL, y a cada uno se adicionó 600mg de Ampicilina sódica inicialmente, y en cada tubo se

adicionaron 4mL de diferentes medios (agua, buffer pH 1,2 y 7,4 respectivamente, las soluciones buffer tenían una fuerza iónica de 0,15M). Se ubicaron los tubos en el carrusel del termostato a una temperatura de 37,0°C y se pusieron a girar a 100 rpm.

Cada cierto tiempo especificado, se observaba que el sistema llegaba a una fase, se procedía a añadir más antibiótico a cada tubo (tablas 19 y 20). A los 22 minutos se observó que el tubo que contenía el medio de pH 1,2 comenzaba a tomar un color amarillo, sin embargo, la ampicilina continuaba solubilizándose en el medio, esta coloración amarilla presuntamente se deba a la formación de un producto de degradación del antibiótico, debido a la exposición a pH ácido y a una temperatura de 35°C.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SATURACIÓN DE AMPICILINA TRIHIDRATADA

La metodología del baño termostático consistió en añadir a seis tubos de vidrio con tapa de rosca, una cantidad conocida de antibiótico, se emplearon cantidades diferentes para evaluar varias concentraciones y un mismo volumen medido de medio, luego los tubos se tapan con parafilm y sobre éste se ajusta la tapa, según el protocolo de sellado descrito anteriormente, para garantizar la hermeticidad de los tubos, los cuales se ubican en un carrusel sumergido en un baño de agua, el cual se encuentra en la temperatura a la que se vaya a realizar el ensayo.

Mediante este método se determinó que la concentración de saturación de la ampicilina trihidratada en agua fue de 9 mg/mL aproximadamente.

ANEXO 5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES BUFFER

Se prepararon dos sistemas buffer de pH 1,2 y 7,4 con una fuerza iónica constante de 0,15 M para la realización de los ensayos. El buffer ácido se preparó con ácido clorhídrico y cloruro de potasio, mientras que para el buffer a pH 7,4 se utilizaron fosfatos mono y dibásico de potasio y cloruro de potasio. Se hizo la preparación según la farmacopea vigente (USP 35-NF 30, 2012), y se ajustó la fuerza iónica al valor requerido con cloruro de potasio.

PREPARACIÓN DEL BUFFER DE PH 1,2 Y FUERZA IÓNICA 0,15 M.

El buffer de pH 1,2 según la farmacopea anteriormente mencionada, se prepara adicionando 425 mL de ácido clorhídrico 0,2 M y 200 mL de cloruro de potasio 0,2 M, y se lleva a 1 L. a continuación se muestran los cálculos realizados para a partir de los reactivos puros.

$$[HCl\ 37\% (M)] = \frac{1,19\ g}{mL} * \frac{1000\ mL}{1\ L} * \frac{1\ mol}{36,45\ g} = 32,65\ M$$

$$V_{HCl\ conc} = \frac{1000\ mL * 0,085\ M}{32,65\ M} = 2,6\ mL$$

$$g\ KCl = \frac{200\ mL * 0,2\ M}{1000\ mL} = 0,040\ M * 1\ L * \frac{58,55\ g\ KCl}{1\ mol\ KCl} = 2,3420\ g\ KCl$$

Por tanto, se requieren 2,6 mL de HCl concentrado y 2,3420 g de KCl para preparar 1 L de buffer de pH 1,2, según requerimientos farmacopeicos.

Partiendo de esto, se calcula primero la fuerza iónica de este sistema, para definir cuánto se requiere de KCl para que la fuerza iónica sea 0,15 M.

$$[HCl] = \frac{425 \text{ mL} * 0,2 \text{ M}}{1000 \text{ mL}} = 0,085 \text{ M}$$

$$[KCl] = \frac{200 \text{ mL} * 0,2 \text{ M}}{1000 \text{ mL}} = 0,040 \text{ M}$$

Fuerza iónica:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2$$

$$\mu = \frac{1}{2} * (((0,085M) * (1)^2) + ((0,085M) * (-1)^2) + ((0,040M) * (1)^2) + ((0,040M) * (-1)^2))$$

$$\mu = 0,125 \text{ M}$$

Se necesita entonces un exceso de KCl que aporte 0,025 M de fuerza iónica al buffer. Se realiza el cálculo para expresar este valor en términos del compuesto en su forma sólida.

$$0,025 \text{ M KCl} * 1 \text{ L} * \frac{58,5 \text{ g KCl}}{1 \text{ mol KCl}} = 1,4638 \text{ g KCl}$$

Por tanto, para preparar el buffer de pH 1,2 con la fuerza iónica requerida, se requiere un total de 3,8058 g de KCl por litro de solución.

PREPARACIÓN DEL BUFFER DE PH 7,4 Y FUERZA IÓNICA DE 0,15 M.

El buffer de pH 7,4 se prepara a partir de fosfato mono y dibásico de potasio, con base en el equilibrio de sistema buffer, es decir, la ecuación de Henderson Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right)$$

En este caso, como el sistema usado (fosfato) tiene tres disociaciones, se usará el valor de la segunda disociación ($pK_{a2} = 7,2$):

$$7,4 = 7,2 + \log\left(\frac{[HPO_4^{-2}]}{[H_2PO_4^{-}]}\right)$$

$$\log\left(\frac{[HPO_4^{-2}]}{[H_2PO_4^{-}]}\right) = 0,2$$

$$\frac{[HPO_4^{-2}]}{[H_2PO_4^{-}]} = 1,585$$

$$[HPO_4^{-2}] = 1,585 * [H_2PO_4^{-}]$$

Si se parte de un sistema buffer que contenga 0,010 M de fosfato dibásico de potasio, se tendría que:

$$[HPO_4^{-2}] = 1,585 * 0,010 M$$

$$[HPO_4^{-2}] = 0,016 M$$

Por tanto, la concentración de fosfato monobásico de potasio en el sistema es de 0,016 M.

Las cantidades necesarias de cada reactivo para llegar a 1 L de solución buffer con las concentraciones descritas anteriormente son:

$$g K_2HPO_4 = 0,010 M * 1 L * \frac{174,2 g}{1 mol} = 1,7420 g$$

$$KH_2PO_4 = 0,016 M * 1 L * \frac{136,09 g}{1 mol} = 2,1774 g$$

Teniendo esto en cuenta, se calcula primero la fuerza iónica de este sistema, para definir cuánto se debe agregar de KCl para llegar a la fuerza iónica de 0,15 M.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2$$

$$\begin{aligned} \mu = \frac{1}{2} * (((0,010 M) * 2 * (1)^2) + ((0,010 M) * (1)^2) + ((0,010 M) * (-2)^2) \\ + ((0,016 M) * (1)^2) + ((0,016 M) * 2 * (1)^2) + ((0,016 M) * (-1)^2)) \end{aligned}$$

$$\mu = 0,076 M$$

Se requiere un exceso de KCl que aporte 0,074 M de fuerza iónica al buffer. El cálculo para expresar este valor en términos del compuesto en su forma sólida.

$$0,074 M KCl * 1 L * \frac{58,55 g KCl}{1 mol KCl} = 4,3327 g KCl$$

Por tanto, para preparar el buffer de pH 7,4 con la fuerza iónica requerida, se necesita entonces un total de 4,3327 g de KCl por litro de solución.

ANEXO 6. CERTIFICADOS DE ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS

CONTROL DE CALIDAD



REPORTE ANALITICO DE MATERIA PRIMA

NOMBRE: **EUDRAGIT E-100** CODIGO **47200313** EMISION: Tecnoquímicas 30 NOV 2010
 (COPOLIMERO METACRILATO BÁSICO BUTILADO) REEMPLAZA A 27 AGO 2007
 No. CONTROL T1077469 LOTE E110401082 OC 100582032 CANTIDAD 10,0K9 NEG 00
 FABRICANTE Evonik PROVEEDOR Almapol Colombia VALIDO HASTA: Mar 2014
 N°DE RECIPIENTES 2 RECIPIENTES MUESTREADOS 2 POR JEAVIA FECHA 02 MAR 2012

ENSAYO FUENTE	ESPECIFICACIONES	METODO ANALISIS	RESULTADO	ESTANDAR LOTE: # 1005797-S VENGE: A 30 2012	FECHA	ANALISTA
*DESCRIPCION	CRISTALES DE FORMA CILINDRICA, INCOLOROS o LIGERAMENTE AMARILLOS, TRANSPARENTES, BRILLANTES CON OLOR A AMINA.	ORGANOLEPTICO	Cristales de forma cilíndrica, translúcidos ligeramente amarillos, B. Alante con olor a Amina	Cristales de forma cilíndrica translúcidos ligeramente amarillos, con olor a Amina	09 mar 2012	R Montiel
IDENTIFICACION (EP 6.0)	A. IR: SIMILAR A ESTANDAR	EP 6.0	Ir similar al Estándar	N/A	16 mar 2012	R Montiel
	B. CUMPLE EL ENSAYO	EP 6.0	Cumple el ensayo	N/A	09 mar 2012	R Montiel
* SOLUBILIDAD (EP 6.0)	PRACTICAMENTE INSOLUBLE EN AGUA	EP 6.0	Prácticamente insoluble en agua	N/A	09 mar 2012	R Montiel
	LIBREMENTE SOLUBLE EN CLORURO DE METILENO	EP 6.0	Libremente soluble en cloruro de metileno	N/A	16 mar 2012	R Montiel
	DISUELVE LENTAMENTE EN ALCOHOL	EP 6.0	Disuelve lentamente en alcohol	N/A	09 mar 2012	R Montiel
VISCOSIDAD (Solución S) (EP 6.0)	ENTRE 3 mPa.s - 6 mPa.s	EP 6.0	4 mPa.s	N/A	09 mar 2012	R Montiel
ABSORBANCIA A 420nm (Solución S) (EP 6.0)	MAXIMO 0,30	EP 6.0	0,00	N/A	09 mar 2012	R Montiel
APARIENCIA DE LA PELICULA (Solución S) (EP 6.0)	SE FORMA UNA PELICULA CLARA CUANDO SECA	EP 6.0	Se forma una película clara cuando seca.	N/A	09 mar 2012	R Montiel
PERDIDA POR SECADO 110°C, 3h (EP 6.0)	MAXIMO 2,0%	EP 6.0	0,8%	N/A	09 mar 2012	R Montiel
MONOMEROS HPLC (EP 6.0)	SUMA DE BUTIL METACRILATO Y METIL METACRILATO Y 2-DIMETILAMINOETIL METACRILATO MAXIMO 0,3%	EP 6.0	< 0,3.	N/A	21 Mar 2012	J. J. J. J.
ETALES PESADOS C (EP 6.0)	MAXIMO 20 ppm	EP 6.0	< 20 ppm	N/A	09 mar 2012	R Montiel
CENIZAS SULFATADAS (EP 6.0)	MAXIMO 0,1%	EP 6.0	0,1%	N/A	09 mar 2012	R Montiel
DISOLVENTES RESIDUALES (EP 6.0)	CUMPLE CON LOS REQUISITOS	EP 6.0	Cumple con los requisitos	N/A	21 mar 2012	El Bolívar
* ENSAYO GRUPOS DIMETILAMINOETIL EN BASE SECA (EP 6.0)	20,8% - 25,5%	EP 6.0	22,6%	N/A	09 mar 2012	R Montiel

* Reanalizar cada dos (2) años
 Fabricante: Evonik Industrias /Almapan Colombia

Almacén en recipientes bien cerrados.
 TECNICA VIGENTE: MP-1634, EMISION 30 NOV 2010

Tecnoquímicas S.A.
 PLANTA JAMUNDI
APROBADO

09 mar 2012

OBSERVACIONES:

CONTROL DE CALIDAD

APROBADO


RECHAZADO

REVISADO POR: DCSánchez

FECHA: 21 Mar 2012

Formato Aprobado por: JC. Villamil

F-SPRC-029-3R4
 Fech. Rev: OCT 2009

CÓDIGO:FC-049	REGISTRO RESULTADO DE MATERIAS PRIMAS	
FECHA: 02		
VALIDO HASTA: NOV/2013	PAGINA 1 DE 1	

Laboratorio: Tecnoquimicas
Producto: Ampicilina Trihidrato Polvo
Lote: F253120
Fecha de Fabricación : Diciembre 2011
Fecha de vencimiento: Noviembre 2016
Fecha de reanálisis: Septiembre 2013
Fabricante: Fersinsa Gb
Cantidad: 75 Kg
Especificación: 47000357 (T.Q)

No. de entrada: M122320
 Aprobado (x)
 Rechazado ()

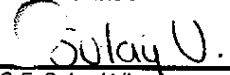
Ensayo	Especificación	Método	Resultado	Fecha
Descripción	Polvo fino blanco cristalino con olor característico	Organoléptico	Cumple	07-Sep-12
Identificación	IR silimar al estándar	USP v	Cumple	11-Sep-12
Solubilidad	Ligeramente soluble en agua. Ligeramente soluble en metanol. Prácticamente insoluble o insoluble en cloroformo	USP v	Cumple	12-Sep-12
Cristalinidad	Cumple con los requisitos	USP v	Cumple	11-Sep-12
Densidad aparente	Mínimo 0,28g/mL	Métodos Generales USP Vigente	0,34g/mL	26-Sep-12
pH Solución 10mg/mL	3,5 - 6,0	USP v	4,57	26-Sep-12
Agua KF	12,0% - 15,0%	USP v	14,4%	14-Sep-12
Impurezas Relacionadas	D-Fenilglicina: Máximo 0,5%	USP v	0,0%	11-Sep-12
	Acido 6-aminopenicilánico: Máximo 0,5%	USP v	0,0%	
	Acido Ampiciloico: Máximo 1,0%	USP v	0,2%	
	Análogo Tiazepina de ampicilina: Máximo 0,3%	USP v	0,1%	
	Isomero 1: Máximo 0,4%	USP v	0,0%	
	Isomero 2: Máximo 0,3%	USP v	0,0%	
	Oligomero 2 de Ampicilina: Máximo 0,6%	USP v	0,0%	
	D-Fenilglicilampicilina: Máximo 0,8%	USP v	0,2%	
	Oligomero 1 de Ampicilina (dimero): 1,0%	USP v	0,2%	
	Oligomero 1 de ampicilina (trimero): Máximo 0,4%	USP v	0,3%	
	Cualquier impureza individual no especificada: Máximo 0,25%	USP v	< 0,25%	
Impurezas totales: Máximo 3,0%	USP v	1,06%		
Disolventes Residuales	Cumple con los requisitos	USP v	Cumple	11-Sep-12
Valoración (Ampicilina)	No menos de 900 µg y no más de 1050 µg de Ampicilina por mg, calculado en B.A.	USP v ₁	853,4 µg / mg B.H.	12-Sep-12
			997,1 µg / mg B.A.	
*Valoración (Ampicilina)	No menos de 900 µg y no más de 1050 µg de Ampicilina por mg, calculado en B.A.	FABRICANTE	852,0 µg / mg B.H.	15-Dic-11
			987,0 µg / mg B.A.	

Observaciones:


Se anexa Informe de Granulometría

*Se aprueba con dato de valoración del fabricante

Responsable :


 Q.F. Sulay Uribe
 Analista de Calidad
 Fecha: 27 Septiembre 2012

Aprobado por:


 Q.F. Constanza Ruge
 Jefe de Calidad
 Fecha: 28-Sep-12

Fersinsa Gb



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product name: ampicillin trihydrate, powder
 Product code: 6.32.23.00
 Active Ingredient: Ampicillin Trihydrate
 Batch/Lot number: F253120
 Batch size: 775.00 kg
 Date of Manufacture: December/2011
 Date of release: 15/December/2011
 Retest/expiry date: November/2016
 Pharmacopoeia quality: Complies with the latest editions of USP, FEUM

Parameter:	Specification:	Result:
Assay (HPLC)		
As such	Min. 84.0 %	85.2 %
On dry basis	Min. 97.0 %	98.7 %
Appearance	White, crystalline powder	conforms
Identification	Conforms with test	conforms
pH	3.5 - 5.5	4.7
Appearance of solution in HCl	Not more opalescent than ref. susp. 2	conforms
in NH4OH	Not more opalescent than ref. susp. 2	conforms
Water	12.0 - 15.0 %	13.7 %
Crystallinity	Crystalline	crystalline
Pyridine *	NMT 200 ppm	41 ppm
Methylene chloride	NMT 2000 ppm	495 ppm
2-propanol	NMT 2000 ppm	581 ppm
Related impurities		
ampicilloic acid	NMT 1.0 %	0.08 %
ampicillenic acid 7MR	NMT 0.3 %	0.02 %
ampicillin dimer	NMT 1.0 %	0.25 %
ampicillin trimer	NMT 0.4 %	0.02 %
ampicillin dimer (open)	NMT 0.6 %	0.02 %
2-(S)-piperazine-2,5-dione	NMT 0.4 %	0.02 %
2-(R)-piperazine-2,5-dione	NMT 0.3 %	0.02 %
N-phenyl glycil ampicillin	NMT 0.8 %	0.20 %
6-aminopenicillanic acid	NMT 0.5 %	0.02 %
alpha phenylglycine	NMT 0.5 %	0.02 %
Any individual unspecified impurity	NMT 0.25 %	0.02 %
Total impurities	NMT 3.0 %	0.7 %

*Checked at regular intervals
 N,N-Dimethylaniline is not used in the manufacturing process of this substance or present on any of the raw materials.

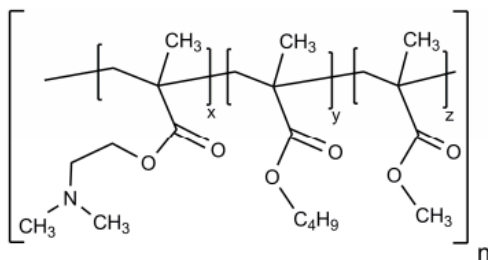
Manufactured by:
 Planta Síntesis, Camino a Guanajuato S/N, Ramos Arizpe, Coahuila, México CP 25900.

Date of issue: 21/08/12

Quality Assurance Department

 Q.F.B. Jose F. Areozola M.

ANEXO 7. ESTRUCTURA Y ESPECTRO FTIR DEL EUDRAGIT E-100, TOMADO DE LA FICHA TÉCNICA DEL EUDRAGIT E-100 DE EVONIC (EVONIK, THECNICAL INFORMATION)



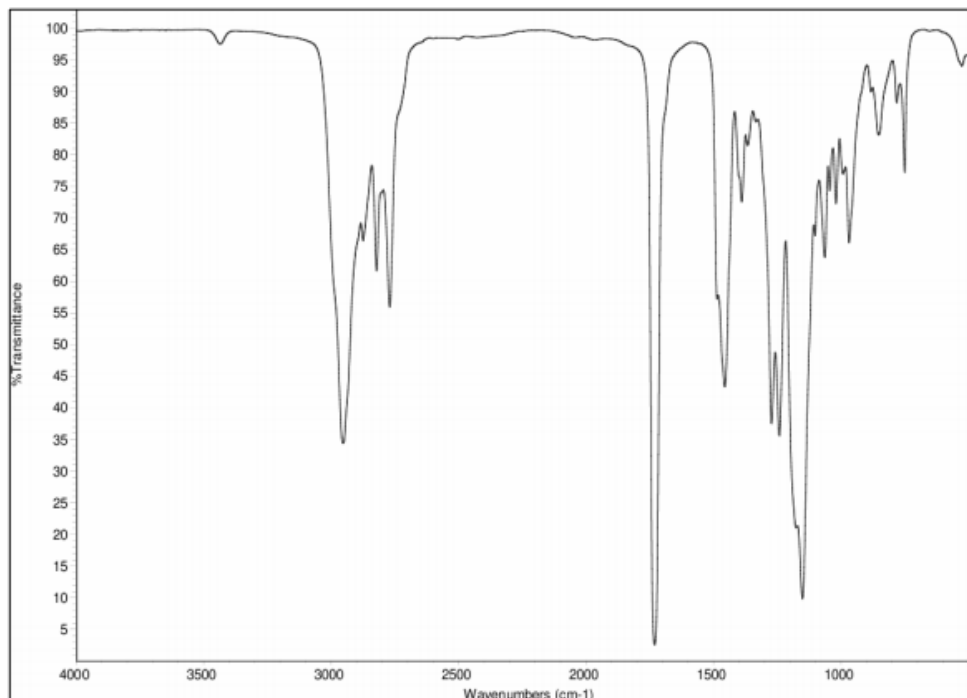
The monomers are randomly distributed along the copolymer chain. Based on SEC method the weight average molar mass (M_w) of EUDRAGIT® E 100; EUDRAGIT® E PO and EUDRAGIT® E 12,5 is approximately 47,000 g/mol.

Second identification

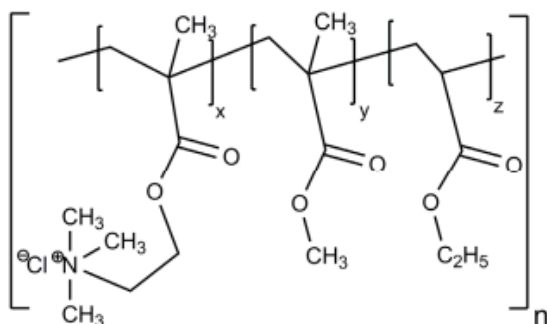
IR spectroscopy on a dry film approx. 15 μm thick. To obtain the film, a few drops of the Test solution are placed on a crystal disc (KBr, NaCl) and dried in vacuo for about 2 hours at 70°C.

The figure on page 5 shows the characteristic bands of the ester groups at 1,150 - 1,190, 1,240 and 1,270 cm^{-1} , as well as the C = O ester vibration at 1,730 cm^{-1} . In addition, CH_x vibrations can be discerned at 1,385, 1,450 - 1,490 and 2,950 cm^{-1} . The absorptions at 2,770 and 2,820 cm^{-1} can be assigned to the dimethylamino groups.

EUDRAGIT® E 100 / EUDRAGIT® E PO / EUDRAGIT® E 12,5



Estructura y espectro FTIR del Eudragit RL, tomado de la ficha técnica del Eudragit RL de Evonic



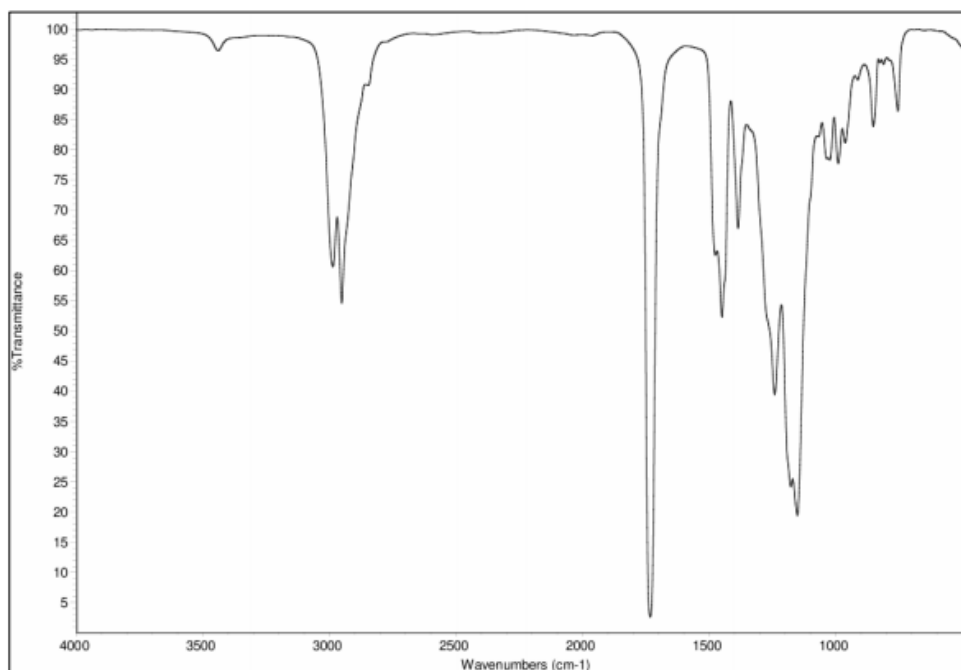
Eudragit RL

Second identification

IR spectroscopy on a dry film approx. 15 μm thick. To obtain the film, a few drops of the Test solution are placed on a crystal disc (KBr, NaCl) and dried in vacuo for about 2 hours at 70 $^{\circ}\text{C}$.

The figures on page 5 and 6 show the characteristic bands of the ester groups at 1,150 - 1,190 and 1,240 - 1,270 cm^{-1} , as well as the C = O ester vibration at 1,730 cm^{-1} . In addition, CHX vibrations can be discerned at 1,385, 1,450, 1,475 and 2,950 - 3,000 cm^{-1} .

EUDRAGIT[®] RL 100 / RL PO



EUDRAGIT[®] RS 100 / RS PO