

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

Caracterización fisicoquímica de la formación de complejos de asociación
polimérica entre el antibiótico ampicilina y el sistema polimérico PAM-18Na₂

ALEJANDRA PAOLA ORTIZ SÁNCHEZ
PAOLA ANDREA ACHIPIZ JIMÉNEZ

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2013

DISEÑO Y FORMULACIÓN DE POTENCIALES FORMAS FARMACEUTICAS DE
ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS ÚTILES FRENTE A MICROORGANISMOS
RESISTENTES:

Caracterización fisicoquímica de la formación de complejos de asociación
polimérica entre el antibiótico ampicilina y el sistema polimérico PAM-18Na₂

ALEJANDRA PAOLA ORTIZ SÁNCHEZ
PAOLA ANDREA ACHIPIZ JIMÉNEZ

Proyecto de grado presentado a la
Universidad Icesi como requisito
de grado

Asesor: Constain Salamanca Mejía, Ph. D

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a Dios, dueño y arquitecto de nuestras vidas, porque nos ha dado la fortaleza y constancia necesarias para finalizar este proyecto. A nuestras familias, por su amor y apoyo incondicional en cada una de nuestras decisiones. A nuestro tutor de tesis, por orientarnos y permitirnos trabajar en el grupo de investigación, por todo su tiempo y esfuerzo invertido para trabajar siempre en pro de nuestro proyecto; y a la Universidad Icesi, que nos ha brindado una formación integral, tanto en lo profesional, como en lo personal.

Alejandra P. Ortiz S. – Paola Andrea Achipiz J.

CONTENIDO

1. RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN	13
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo General	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	17
4.1 Marco teórico y estado del arte	17
4.1.1 Aspectos generales de la Ampicilina.....	17
4.1,2 Poli-electrolitos	18
4.1.3 Sal sódica del poli (ácido maleico-alt-octadeceno) (PAM-18- <i>Na</i> ₂)	20
4.1.4 Estudios de solubilidad.....	22
4.2 Aporte intelectual del investigador.....	24
4.3 Impacto ambiental	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Obtención de la sal sódica del poli (anhídrido maleico- <i>alt</i> -octadeceno) PAM-18Na ₂	25
5.2 Purificación de la sal sódica del poli(ácido maleico- <i>alt</i> -octadeceno) PAM-18Na ₂	26
5.2.1 Ultrafiltración	26
5.2.2 Diálisis	27
5.2.3 Liofilización.....	28
5.3 Caracterización de la sal sódica del poli(ácido maleico- <i>alt</i> -octadeceno) PAM-18Na ₂	28
5.4 Validación de una metodología analítica para la cuantificación de ampicilina trihidratada utilizando espectrofotometría UV.....	29
5.5 Estandarización de la metodología para los estudios de solubilidad.....	29
5.6 Ensayos de solubilidad del sistema de asociación fármaco (ampicilina)-polímero (PAM-18Na ₂)	30
5.7 Tratamiento y análisis de datos.....	31
5.8 Preparación de los sistemas buffer	32

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1 Obtención de la sal sódica del poli(ácido maleico- <i>alt</i> -octadeceno) PAM-18Na ₂	33
6.2 Descripción de la morfología externa general de los materiales de estudio en estado sólido.	35
6.3 Estandarización de la metodología de agitación para los estudios de solubilidad de la ampicilina en medios acuosos biorreleventes.....	36
6.4 Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en los medios acuosos de estudio	38
7. CONCLUSIONES	44
8. RECOMENDACIONES.....	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXO 1: Validación de una metodología analítica para la cuantificación de ampicilina trihidratada utilizando el espectrofotómetro UV.	48
Prueba t-Student para el Coeficiente de Correlación.....	77
ANEXO 2: Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina sódica y Estandarización de las técnicas de saturación de fase.....	79
A.2.3 Determinación de la concentración de saturación del fármaco.....	82
ANEXO 3: Resultados del análisis de varianza	89
ANEXO 4: Preparación de los medios acuosos buffer pH 1,2 y pH 7,4.....	93
A.4.1 Preparación del buffer de pH 1,2 y fuerza iónica 0,15 M.	93
A.4.2 Preparación del buffer de pH 7,4 y fuerza iónica de 0,15 M	94
ANEXO 5: Certificado de análisis del proveedor para la ampicilina.....	97

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental usado para el análisis de los perfiles de disolución ...	31
Tabla 2. Cantidad de ampicilina trihidratada disuelta en medios acuosos, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37.0°C de temperatura	42
Tabla 3. Condiciones de estrés utilizadas para cada fármaco para evaluar su degradación.....	50
Tabla 4. Evaluación de la repetibilidad del método a diferentes medios.....	54
Tabla 5. . Evaluación de la repetibilidad del sistema a diferentes medios.....	55
Tabla 6. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 25,0°C.....	57
Tabla 7. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 30,0°C.....	59
Tabla 8. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 35.0°C.....	60
Tabla 9. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 40,0°C.....	61
Tabla 10. Resultados de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para ampicilina en agua	62
Tabla 11. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en Medio Buffer pH 1,2 a 25,0°C.....	63
Tabla 12. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en Medio Buffer pH 1,2 a 30.0°C.....	65
Tabla 13. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 1,2 a 35,0°C	66
Tabla 14. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 1,2 a 40,0°C	68
Tabla 15. Resultados de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para ampicilina en medio Buffer pH 1,2.....	69
Tabla 16. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 7,4 a 25,0°C	70
Tabla 17. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 7,4 a 30,0°C	72
Tabla 18. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 7,4 a 35,0°C	74
Tabla 19. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 7,4 a 40,0°C	75
Tabla 20. Resultados de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para ampicilina en medio Buffer pH 7,4.....	76
Tabla 21. Datos para la prueba t-student para el coeficiente de correlación R.....	77
Tabla 22. Ubicación de los termómetros en el baño.....	80

Tabla 23. Medición del volumen de los tubos cerrados con tapa, cada 30 minutos	81
Tabla 24. Medición del volumen de los tubos cerrados con refuerzo de parafilm, después de 15 minutos	82
Tabla 25. Evaluación de la solubilidad de ampicilina sódica en dos medios diferentes (Agua y solución buffer pH 1,2).....	83
Tabla 26. Evaluación de la solubilidad de ampicilina sódica en tres medios diferentes (Agua y soluciones buffer pH 1,2 y 7,4).....	84
Tabla 27. Valores de solubilidad intrínseca para los medios acuosos.....	92

CONTENIDO DE IMÁGENES

Imagen 1. Núcleo del antibiótico betalactámico, del grupo de las penicilinas ¹⁰	18
Imagen 2. Estructura química de la ampicilina trihidratada ¹¹	18
Imagen 3. Proceso de concentrado de poli-electrolito en una celda de ultrafiltración marca amicon®	26
Imagen 4. Fotografías de los equipos utilizados para la saturación de fase acuosa de la ampicilina. A. equipo de agitación orbitalaria. B. equipo de agitación angular. C. equipo de agitación magnética	30
Imagen 5. Espectros IR de los materiales poliméricos poli(anhídrido maleico-alt-octadeceno) (línea roja) y la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-octadeceno)(línea celeste).....	34
Imagen 6. Fotografías de escaneo electrónico para el fármaco y los materiales poliméricos de estudio.....	36
Imagen 7. Espectros UV de los sistemas buffer pH 1,2 (izquierda) y pH 7,4 (derecha) con fuerza iónica (μ) de 0,15 mol/L en ausencia del antibiótico.....	48
Imagen 8. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) recién preparadas en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M	49
Imagen 9. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) recién preparadas en buffer pH 7,4 y μ 0,15 M	49
Imagen 10. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M bajo condiciones de estrés.....	50
Imagen 11. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 7,4 y μ 0,15 M bajo condiciones de estrés.....	51
Imagen 12. Espectros UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M en función del tiempo bajo condiciones de estrés. La línea vertical negra corresponde a la longitud de onda adecuada para los ensayos (256,00 nm)	52
Imagen 13. Espectros UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M en función del tiempo bajo condiciones de estrés. La línea vertical negra corresponde a la longitud de onda adecuada para los ensayos (256,00 nm)	52
Imagen 14. Tabla t-Student.....	78
Imagen 15. Ubicación de los termómetros en el baño y registro de las temperaturas de los cuatro termómetros.....	79

CONTENIDO DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Valores de conductividad del medio acuoso externo del proceso de diálisis para las soluciones poliméricas de PAM-18Na ₂	28
Gráfica 2. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en medio acuoso a una temperatura de 37,0°C; empleando tres métodos de agitación: (Δ) Agitación magnética, (\diamond) Agitación angular y (\square) Agitación orbital	37
Gráfica 3. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en medio acuoso a 37 °C de temperatura, utilizando tres velocidades de agitación orbitalaria. (Δ) 200 rpm, (\circ) 350 rpm y (\square) 500 rpm	38
Gráfica 4. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en tres medios acuosos. (\circ) Agua pura tipo II, (Δ) medio buffer pH: 7,4 con $I_m=0,15$ M y (\square) medio buffer pH: 1,2 con $I_m=0,15$ M, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37,0°C de temperatura	39
Gráfica 5. Efecto del medio acuoso sobre el perfil de saturación de fase acuosa de La ampicilina con y sin polímero a temperatura de 37,0°C. (\diamond) Agua tipo II; (\square) solución buffer pH 7,4 sin polímero, con fuerza iónica de 0,15 M; (Δ) solución buffer pH 1,2 con polímero con fuerza iónica de 0,15 M; (x) solución buffer pH 7,4 con polímero, con fuerza iónica de 0,15 M; y (*) solución buffer pH 1,2 con polímero, con fuerza iónica de 0,15 M.....	39
Gráfica 6. 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 37,0°C de temperatura. (\square) Medio con PAM-18Na ₂ . (\diamond) Medio sin PAM -18Na ₂	41
Gráfica 7. 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 37,0°C de temperatura. (\diamond) Medio con PAM -18Na ₂ . (\square) Medio sin PAM -18Na ₂	41
Gráfica 8. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 25,0°C	58
Gráfica 9. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 30,0°C	59
Gráfica 10. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 35,0°C	60
Gráfica 11. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 40,0°C	61
Gráfica 12. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 25,0°C	64
Gráfica 13. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 30,0°C	65
Gráfica 14. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 35,0°C	67
Gráfica 15. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 40,0°C	69
Gráfica 16. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 25,0°C	71
Gráfica 17. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 30,0°C	73
Gráfica 18. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 35,0°C	74

Gráfica 19. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 40,0°C	75
Gráfica 20. Temperatura registrada por los termómetros T1, T2, T3 y T4 vs. Número de toma	80
Gráfica 21. Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en tres medios (solución buffer pH 1,2; (solución buffer pH 7,4 y agua) empleando el Termostato como equipo de agitación, a temperatura de 37,0°C....	88
Gráfica 22. Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en tres medios (solución buffer pH 1,2; (solución buffer pH 7,4 y agua) empleando el Agitador magnético a temperatura de 37,0°C	88
Gráfica 23. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en medio acuoso a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◌) Repetición 2, y (◻) Repetición 3	89
Gráfica 24. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución acuosa de buffer pH 1,2 a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◌) Repetición 2 y (◻) Repetición 3	90
Gráfica 25. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución polimérica de buffer pH 1,2 a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◌) Repetición 2, y (◻) Repetición 3.....	90
Gráfica 26. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución acuosa de buffer pH 7,4 a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◌) Repetición 2, y (◻) Repetición 3.....	91
Gráfica 27. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución polimérica de buffer pH 7,4 a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◌) Repetición 2, y (◻) Repetición 3.....	91

CONTENIDO DE ESQUEMAS

Esquema 1. Hidrólisis del anhídrido maleico y su posterior formación a un poli-electrolito o un ionómero	21
Esquema 2. Perfiles de solubilidad a) en función del tiempo, b) estándar	23
Esquema 3. 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.....	27
Esquema 4. Proceso de hidrólisis en medio acuoso, necesario para la obtención del sistema ionomérico PAM-18Na ₂	33
Esquema 5. Formación de la sal sódica del PAM-18Na ₂	34

1. RESUMEN

En éste proyecto se evaluó la capacidad del material polimérico anfifílico sal sódica del poli(ácido maleico-*alt*-octadeceno) 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, partiendo por un proceso químico de hidrolisis catalizada en medio básico, 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 bajo condiciones específicas (temperatura: 37,0°C, fuerza iónica: 0,15 M y pH: 1,2 y 7,4). 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 material polimérico, encontrándose diferencias significativas cuando dicho material se encuentra presente en la fase de disolución del fármaco.

1. ABSTRACT

In the present study the sodium salt of the amphiphilic Poly (maleic acid-*alt*-1-octadecene) was used to modify the thermodynamic properties of the solubilization process related to the ampicillin trihydrate using biorelevant dissolution media and thereby acquire relevant data in order to know its potential as polymeric material useful in the design of novel formulations of β -Lactam antibiotics used in the treatment of infections associated with resistant microorganisms. Using standardized methodologies the first step was a catalyzed basic hydrolysis and then purification by dialysis and lyophilization. The quantification were made with UV-VIS spectroscopy under specific conditions (temperature: 37,0°C, ionic strength: 0,15 M and pH: 1,2 y 7,4). This investigation also report three methodologies of liquid phase saturations of the antibiotic focused to obtain the intrinsic solubility values. As a final aspect this report shows the impact or the consequence in the use of the amphiphilic polymer in terms of intrinsic solubility attributing a gain when the obtained material is present in the drug solubilization phase.

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, algunos microorganismos han venido desarrollando mecanismos de resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos, lo cual ha generado un gran desafío para la industria farmacéutica, tanto en la obtención de nuevos compuestos con este tipo de actividad farmacológica, como en el diseño y la formulación de nuevas formas farmacéuticas que puedan solucionar este problema¹.

La resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias se debe a varios factores, entre ellos, el uso inadecuado de estos medicamentos, que parece ser una de las principales causas. El problema se agrava debido a los grandes retos y esfuerzos que implica el desarrollo de nuevas moléculas más potentes, lo que hace que la industria farmacéutica esté poco interesada en ello. Lo más próximo que se ha conseguido son los antibióticos de amplio espectro, que tienen la capacidad de combatir algunas, pero no todas las especies de microorganismos existentes. Aunque son los más ampliamente utilizados, son también los responsables de la aparición de las resistencias, debido al consumo indiscriminado.²

En el proceso de desarrollo de un producto farmacéutico, están involucradas una serie de etapas, cuya finalidad consiste en estudiar, analizar y evaluar de manera detallada todas las variables a tener en cuenta en el desarrollo de un medicamento, desde la etapa de investigación y transferencia tecnológica (escalonamiento) hasta el desarrollo del producto a escala industrial, para posteriormente ser comercializado.³

El proceso de selección racional de nuevos compuestos como principios activos potenciales es crítico en términos de tiempo y de costos, tanto en la fase de descubrimiento, como en la de desarrollo de nuevos fármacos. Las estadísticas indican que la probabilidad que un nuevo compuesto sintetizado en el proceso de descubrimiento devenga en un producto farmacéutico comercialmente viable es menor de 1/10.000, por lo que alguna de las razones que influyen en esta probabilidad, se relacionan con aspectos científicos y comerciales y otras, con características fisicoquímicas inadecuadas, que en última instancia determinan una baja biodisponibilidad o eficiencia en estudios clínicos humanos.⁴

A menudo, la solución a estos problemas se encuentra en el proceso de pre-formulación, donde se determinan las propiedades físicas, químicas y mecánicas del principio activo. En el diseño de un medicamento se deben

considerar tres propiedades fundamentales: seguridad, eficacia y confiabilidad del producto; las cuales están estrechamente relacionadas con una serie de características que se le confieren durante su preparación, como estabilidad física, química, microbiológica, toxicológica y terapéutica.⁵

El proyecto está enfocado hacia estos estudios de pre-formulación que permitan diseñar una forma farmacéutica que le confiera mayor estabilidad, seguridad y eficacia al fármaco. En esta etapa es prioritario tener disponibilidad de los datos en una fase temprana del diseño del medicamento, con el fin de adoptar las medidas necesarias para definir las propiedades fisicoquímicas y la manera como éstas podrían afectar el desarrollo potencial de una posible forma farmacéutica.⁶

Para este proyecto se ha elegido trabajar con el antibiótico Ampicilina (en sus formas sódica y trihidratada), debido a que es uno de los antibióticos beta-lactámicos más ampliamente utilizado por médicos y pacientes, además que es un antibiótico de amplio espectro que se encuentra incluido en el Plan Obligatorio de Salud (POS), por lo que puede ser fácilmente accesible para las personas y por tanto, facilitar el consumo indiscriminado. Otra razón por la cual se ha elegido este principio activo, es porque presenta una baja solubilidad en medio acuoso, lo cual afecta su biodisponibilidad en el organismo.

Para abordar el problema planteado previamente, el proyecto está orientado en el desarrollo de una serie de estudios fisicoquímicos empleando sistemas reservorios, transportadores y liberadores de agentes farmacológicos con alta especificidad y actividad en el lugar de su acción biológica, sin efectos toxicológicos; lo cual es un modelo ideal que está tratando de alcanzarse por medio de numerosas investigaciones, donde la función de los poli-electrolitos se destaca ampliamente, debido a sus propiedades de estabilidad y biocompatibilidad.⁷

Asimismo, aquellos poli-electrolitos que presentan la capacidad de generar micro y nano fases en medio acuoso, se perfilan como potenciales matrices farmacéuticas, ya que es posible modular el tamaño, grado y estabilidad de los microentornos hidrofóbicos, frente a diversos factores como el pH o la fuerza iónica, que son variables de gran importancia en el ámbito biológico. Así, la eficacia terapéutica de muchos fármacos de bajo y mediano peso molecular y baja polaridad se puede mejorar combinándolos con dichos agentes poliméricos.⁸

Por lo anterior, la aplicación que este proyecto tendría, sería de gran relevancia, puesto que constituiría un aporte a la investigación, para solucionar no solo los problemas de resistencia bacteriana, sino también para mejorar las características fisicoquímicas y biofarmacéuticas mejorando la calidad de la salud de la comunidad.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Obtener los perfiles de solubilidad del sistema de asociación entre el fármaco ampicilina trihidratada y el polímero PAM-18Na₂ en diferentes medios y bajo diferentes condiciones de pH y temperatura fisiológica, a fuerza iónica constante.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar y caracterizar fisicoquímicamente el sistema polimérico: PAM-18Na₂, aplicando la metodología previamente estandarizada y utilizada en el laboratorio de investigación en fisicoquímica farmacéutica.
- Realizar la validación de una metodología analítica para determinar la concentración intrínseca del principio activo ampicilina trihidratada, bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, evaluando algunos parámetros como selectividad, linealidad, y repetibilidad.
- Evaluar la solubilidad del complejo fármaco-polímero (Ampicilina trihidratada- PAM-18Na₂) en medio acuoso y a diferentes condiciones de pH (1,2 y 7,4), 37,0°C y fuerza iónica de 0,15M.

4. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

4.1 Marco teórico y estado del arte

Estado del arte.

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 farmacotécnica, biofarmacéuticas y de estabilidad fisicoquímica y biológica. La propuesta investigativa radica en evaluar la potencialidad de las sales sódicas del poli(acido-alt-octadeceno), como novedosos sistemas excipientes de medicamentos. En este sentido, se espera que el polímeros anfifílico sal sódica del poli(acido-alt-octadeceno) que presenta la capacidad de auto-organizarse, generando nano y micro agregados hidrofóbicos en medios acuosos, pueden asociar sustratos farmacológicos por interacciones específicas con las pseudofases poliméricas; para mejorar las características fisicoquímicas de la ampicilina, y así poder evidenciar su potencial aplicación como matrices farmacéuticas, mejorando el perfil farmacocinético, así como su bioestabilidad frente a microorganismos productores de enzimas que pueden degradar a los agentes farmacológicos, tal como sucede con los antibióticos beta-lactámicos.

4.1.1 Aspectos generales de la Ampicilina

La ampicilina corresponde a un antibiótico de tipo betalactámico, el cual se subdivide en otros grupos, tales como: cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos, penicilinas, etc. El antibiótico en estudio, se encuentra en el subgrupo de las penicilinas, dichos antibióticos contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina dentro de su estructura, los cuales forman el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar a los anillos fusionados característicos.⁹

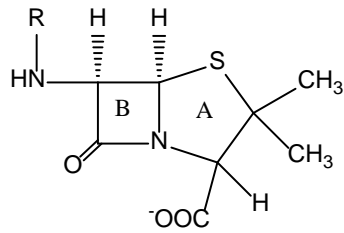


Imagen 1. Núcleo del antibiótico betalactámico, del grupo de las penicilinas¹⁰

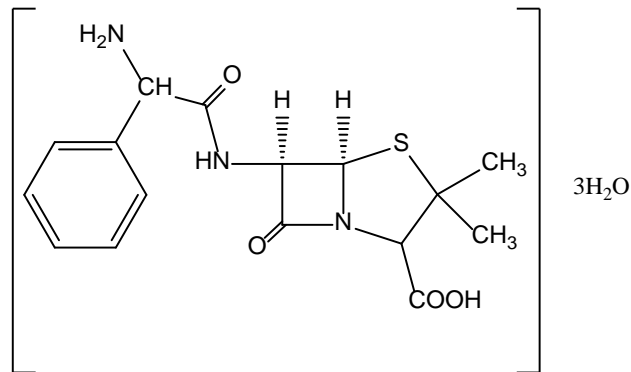


Imagen 2. Estructura química de la ampicilina trihidratada¹¹

Los antibióticos betalactámicos en general, actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Después de interactuar con las proteínas de unión a la penicilina de la bacteria, inhiben la enzima de transpeptidación que establece puentes cruzados entre las cadenas peptídicas que están unidas al esqueleto de peptidoglucano.¹²

De manera general, estos antibióticos se administran vía oral o, en las infecciones más graves, vía intravenosa. La ampicilina es el antibiótico de primera elección frente a infecciones respiratorias, óticas, sinusales y meningitis causadas por microorganismos gramnegativos, 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.¹³

4.1,2 Poli-electrolitos

Los poli-electrolitos son sistemas macromoleculares que presentan una fracción significativa de cargas en su cadena polimérica, por lo que

comúnmente se denominan poliiones¹⁴. Dentro de las propiedades de los poli-electrolitos, se encuentra la capacidad de formar sistemas microheterogéneos, semejantes a las micelas y/o vesículas poliméricas. Esta propiedad se debe a la capacidad de la macromolécula de auto organizarse cuando se encuentra en medios acuosos, adquiriendo diferentes conformaciones.¹⁵

La investigación extensiva y los esfuerzos encaminados a mejorar constantemente las características de los polímeros, además de sus mecanismos de protección y transporte, conllevan al desarrollo de nuevos medicamentos, con materiales poliméricos cada vez más específicos en su función a cumplir, como por ejemplo, obtener un control preciso y ajustable de liberación del principio activo, o ejerciendo un mecanismo de protección biológico o fisicoquímico.¹⁶

Este tipo de polímeros, cuando entran en contacto con un disolvente polar como el agua, de manera espontánea interactúa favorablemente mediante sus cargas, y adquiere distintas conformaciones, su comportamiento depende de varios factores, entre ellos su carga, pH del medio, peso molecular, concentración de sal e iones dispersos en el medio y su balance hidrófilo/hidrófobo que a su vez depende de la estructura química de éste. En algunos casos se ha determinado que se expanden debido a la repulsión electrostática entre sus grupos cargados, o que se contrae si sus grupos cargados se neutralizan. Algunas de las propiedades deseadas de los materiales precursores de poli-electrolitos, es que sean biocompatibles, fácilmente difusibles en el agua, que presenten carácter anfifílico; algunas de estas propiedades son adaptadas al formar un copolímero a partir de varios monómeros.¹⁷

En el ámbito de la industria farmacéutica, los polímeros se vienen utilizando principalmente como sistemas de transporte de fármacos (drug carrier) o como sistemas contenedores o reservorios de fármacos (drug reservoir), que son aquellos que presentan en su estructura macromolecular grupos funcionales tales como: Éster, lactonas, carboxilatos y derivados del anhídrido maleico como en el caso de estudio, donde su utilización es aceptada debido a que son grupos funcionales biocompatibles.¹⁸

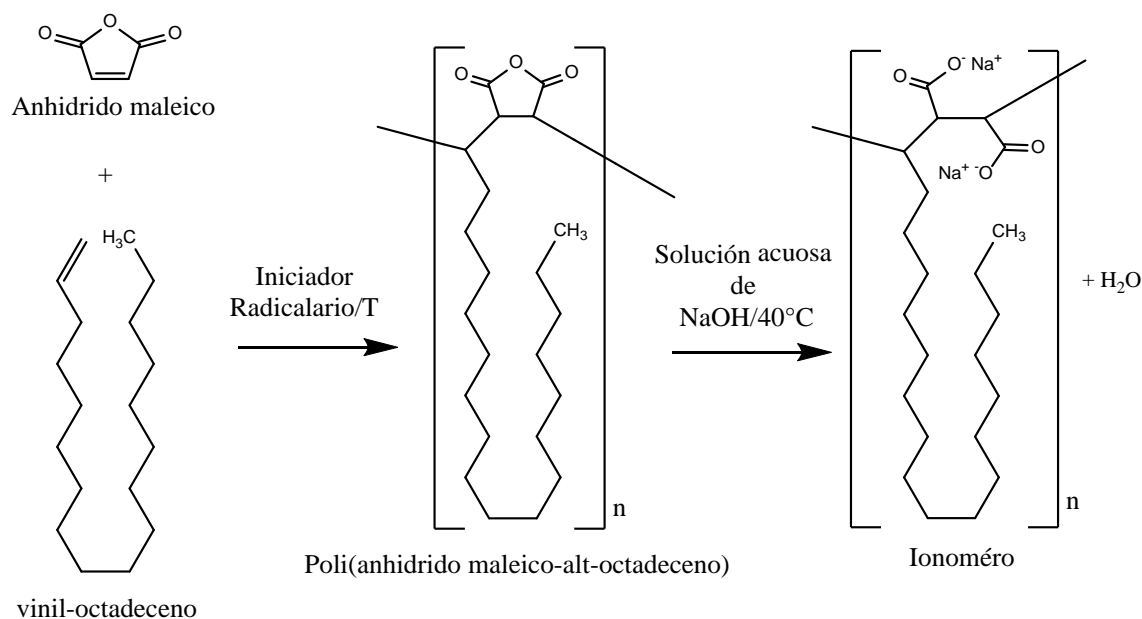
Otra de las características importantes que proporcionan los poli-electrolitos a las moléculas de principios activos los poli-electrolitos, es que pueden mejorar la solubilidad de la molécula encapsulada o atrapada en sus cadenas por adsorción física, además la protección del agente encapsulado de los cambios ambientales que podría experimentar, tales como pH o fuerza iónica.¹⁹

Los polímeros biodegradables cubren un área extensa de compuestos de alto peso molecular. Por lo general, se distinguen entre los polímeros biodegradables de origen natural y de origen sintético. Los polímeros biodegradables naturales son el resultado de una síntesis desarrollada durante millones de años de evolución, la cual conduce a materiales hechos para diferentes aplicaciones en la naturaleza; estos biopolímeros incluyen proteínas, oligosacáridos, ácidos nucleicos y lípidos generalmente, que muestran características completamente diferentes dependiendo de la situación en la que se utilizan.²⁰

Los polímeros sintéticos por otra parte, son el resultado de casi un par de siglos de investigación y desarrollo; estos son susceptibles a la biodegradación y pueden ser de diferentes tipos, un ejemplo de ellos son los polímeros que contienen poliésteres hidrolizables. Actividades de investigación recientes de polímeros sintéticos biodegradables se han enfocado en la simulación de diferentes biopolímeros o polímeros con cadenas principales degradables, por ejemplo, polianhídridos, policarbonatos, polilactonas, etc. Otros conceptos en la búsqueda de nuevos materiales biodegradables que se incluyen son, el uso de microorganismos que pueden producir ciertos polímeros, por ejemplo, poli (β -hidroxibutirato) (PHB) y los copolímeros de PHB, donde los difíciles pasos de síntesis y purificación que conducen a bajos rendimientos, se evitan mediante el uso de estos microorganismos.²¹

4.1.3 Sal sódica del poli (ácido maleico-alt-octadeceno) (PAM-18- Na_2)

La gran utilización del anhídrido maleico como precursor de sistemas macromoleculares, reside en su tendencia a formar copolímeros alternantes, que pueden posteriormente ser convertidos a poli-electrolitos, gracias al rompimiento hidrolítico del grupo anhídrido, que da origen a la formación de dos grupos carboxilato, confiriéndole de esta manera, las características de macroión, y facilitando su solubilidad en medios acuosos (Ver esquema 1).



Esquema 1. Formación del Poli(anhídrido maléico-alt-octadeceno) a partir de las unidades monoméricas e Hidrólisis del grupo anhídrido maléico y su posterior formación a un ionómero

En este sentido, se espera que los sistemas poliméricos obtenidos a partir de anhídrido maléico presenten la capacidad de formar pseudofases hidrofóbicas en solución acuosa, que puedan asociarse con fármacos como antibióticos y así, puedan mejorar las características fisicoquímicas del principio activo y su estabilidad biológica frente a la degradación, tal como sucede con las enzimas betalactamasas.²²

Cuando los ionómeros se encuentran en solución acuosa, pueden adquirir diferentes geometrías conformacionales dependiendo de la concentración de contraiones presentes en la solución. A bajas concentraciones de poli-electrolito puede adquirir conformaciones extendidas, mientras que a altas concentraciones de poli-electrolito, éste adquiere conformaciones aleatorias. En general, se puede afirmar que los cambios conformacionales de un poli-electrolito en solución, se ven influenciadas por un balance entre las repulsiones electrostáticas generadas por las cargas en la cadena principal polimérica y las repulsiones hidrofóbicas generadas entre las cadenas laterales y el solvente.²³

En los poli-electrolitos con grupos ionizables débiles, es posible que se formen micro o nano dominios hidrofóbicos sólo a bajos valores de pH o cuando existe una alta concentración de contraiones por efecto de electrolito simple adicionado. Esto ocurre cuando se alcanza un grado de apantallamiento tal,

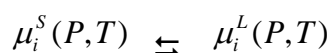
que la repulsión electrostática entre los grupo carboxílicos ionizados es mínima, y por lo tanto, la asociación de las cadenas laterales es posible.²⁴

Además de las ventajas mencionadas anteriormente, se puede resaltar una amplia aplicabilidad que representan las sales poliméricas en el área de estabilidad farmacéutica, ya que estas matrices pueden tener la capacidad de proteger a los fármacos de la acción de las enzimas, así como de otros factores o condiciones ambientales como humedad, luz y temperatura.²⁵

4.1.4 Estudios de solubilidad

Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes de los principios activos está relacionada con la capacidad de solubilizarse en medio acuoso, debido a que este es uno de los parámetros primarios e indispensables del perfil farmacocinético. Estos estudios resultan fundamentales en las etapas de pre-formulación y re-formulación, en los que se evalúan bajo diferentes condiciones y sistemas o solventes de uso farmacéutico²⁶.

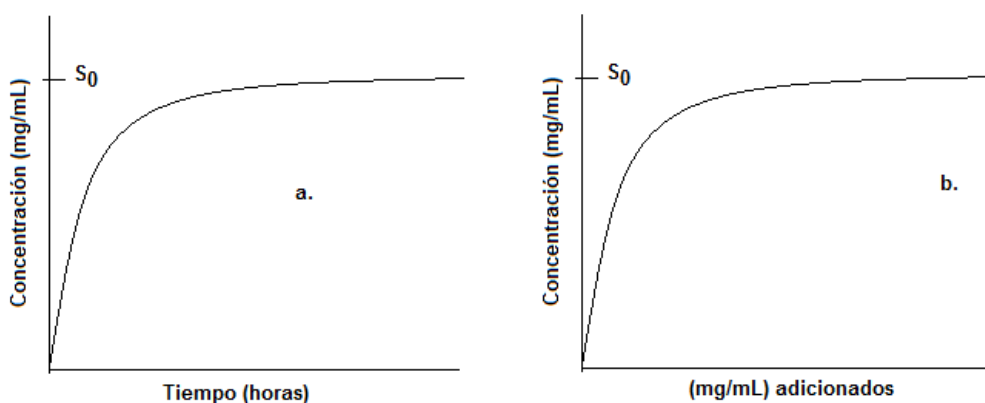
Los estudios de solubilidad, también conocidos como estudios de saturación de fase líquida por parte de solutos adicionados a un sistema de mezcla homogénea, corresponden a un proceso de equilibrio termodinámico que se genera entre el soluto en estado sólido y el soluto en estado líquido, disuelto a 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 farmacológica²⁵. 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, y un ejemplo común son los excipientes²⁶. 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.

Para estos ensayos, la primera metodología empleada, consiste en adicionar una cantidad fija de fármaco a todos los viales o frascos, y a esta agregarles una cantidad de solvente determinada, se somete a agitación, 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 degradan 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 en estado sólido exactamente pesadas 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, la cual se establece en virtud de la condición de degradación del soluto²⁶.



Esquema 2. Perfiles de solubilidad a) en función del tiempo, b) estándar

Estos perfiles de solubilidad, permiten determinar la concentración de saturación o S_0 del fármaco en presencia del medio y el pH a evaluar. Por tanto, estos parámetros proporcionan información importante acerca de los mecanismos de asociación y liberación de la ampicilina por parte de los

materiales de estudio en esta investigación²⁷. 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°C²⁸.

4.2 Aporte intelectual del investigador

Debido a la problemática de la resistencia bacteriana hacia los antibióticos beta-lactámicos convencionales; este proyecto se encamina a la investigación de nuevas alternativas de recuperación de la actividad de dichos antibióticos fácilmente asequibles, que en nuestro caso corresponde a ampicilina trihidratada; donde la estrategia consiste en asociar el antibiótico al material polimérico sal sódica del poli(ácido maleico-alt-octadeceno); y así, la presente investigación se enmarca en obtener información fisicoquímica básica que aporte a los estudios de pre-formulación donde se evalúe el efecto que tendrá el material polimérico PAM-18-Na₂ sobre el proceso termodinámico de solubilización de la ampicilina en medios de disolución biorrelevantes.

4.3 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.

5. METODOLOGÍA

Materiales

Los compuestos utilizados en la sección experimental fueron: ampicilina trihidratada, la cual fue proporcionada por laboratorios Tecnoquímicas S.A y la cual contaba con su correspondiente certificado de análisis de control de especificaciones de calidad, el cual se encuentra en el anexo 5. Por otro lado, se utilizó como material polimérico de partida al poli(ácido-maleico-*alt*-octadeceno) marca Aldrich®. Para el proceso de hidrólisis se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) 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 pH de 7,4 y fuerza iónica de 0,15 M, se utilizaron fosfatos mono y dibásico de potasio y cloruro de potasio marca Merck®, los cuales fueron preparados siguiendo los métodos previamente establecidos en la farmacopea vigente (USP 35-NF 30, 2012).

5.1 Obtención de la sal sódica del poli (anhídrido maleico-*alt*-octadeceno) PAM-18Na₂

5.1.1 Hidrólisis básica del poli (anhídrido maleico-*alt*-octadeceno) PAM-18 en medio acuoso

La síntesis de la sal sódica del poli(ácido maleico-*alt*-octadeceno) PAM-18Na₂, se llevó a cabo mediante una hidrólisis con hidróxido de sodio en medio acuoso, empleando una metodología previamente estandarizada por el Laboratorio de investigación en Físicoquímica Farmacéutica, del Grupo Natura; para ello, el procedimiento se realizó a partir del copolímero comercial poli(anhídrido maleico-*alt*-octadeceno) (Aldrich). Se prepararon 200mL de NaOH 5 N, pesando 40 g de NaOH en 200 mL de agua destilada. Posteriormente, se pesó aproximadamente 30 g de PAM-18 (marca comercial Aldrich) y se llevó a un vaso precipitado de 1000 mL, seguidamente, se agregó 800mL de agua destilada con agitación magnética constante a una temperatura de 40,0°C; finalmente, se agregó diariamente gotas de una solución acuosa de NaOH 5 N, hasta obtener una dispersión homogénea. La cantidad total de solución básica adicionada fue de 20 gotas.

5.2 Purificación de la sal sódica del poli(ácido maleico-*alt*-octadeceno) PAM-18Na₂

Una vez realizada la reacción de hidrólisis para la obtención del polímero PAM-18Na₂, se procedió a filtrar al vacío dichas soluciones, utilizando papel filtro marca Waltman Grado 1:11 μm , con el fin de eliminar a las partículas suspendidas correspondientes al polímero que no se hidrolizó. Seguidamente, se sometieron a procesos de ultrafiltración, diálisis y liofilización, que se explican a continuación.

5.2.1 Ultrafiltración

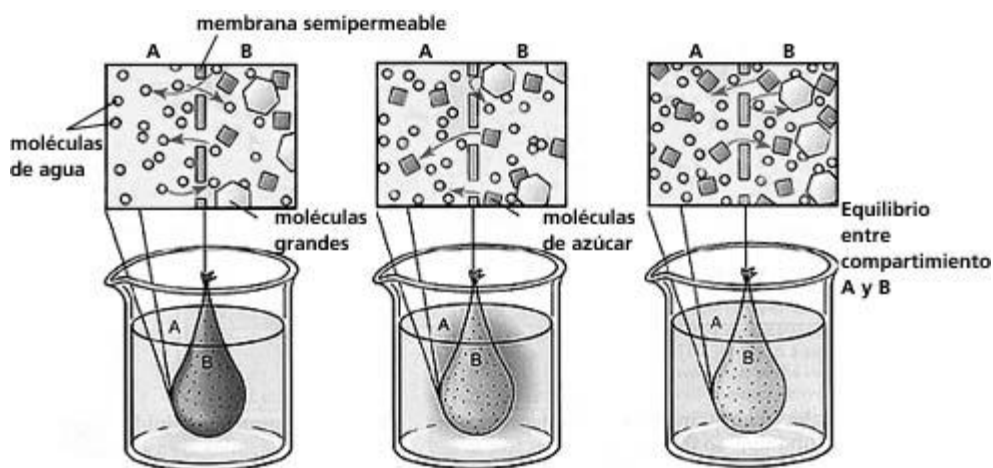
Con el propósito de concentrar el polímero, para eliminar el exceso de iones sobrantes en el proceso de hidrólisis, se llevó a cabo un proceso de ultrafiltración. Este proceso se realizó empleando una celda de ultrafiltración marca Amicon[®], con una capacidad de 50 mL, la cual se llenó hasta dicho volumen con la dispersión polimérica. Acto seguido, la celda se sometió a agitación magnética y a una presión de 3.065 atm; una vez se alcanzó un volumen de 20 mL de dispersión polimérica ultra-filtrada, se procedió al almacenamiento de la disolución hasta el proceso de diálisis. En cada proceso de preconcentración del material polimérico en medio acuoso, se utilizaron membranas de celulosa regenerada, con un tamaño de poro de retención de 10.000 Da.



Imagen 3. Proceso de concentrado de poli-electrolito en una celda de ultrafiltración marca amicon[®]

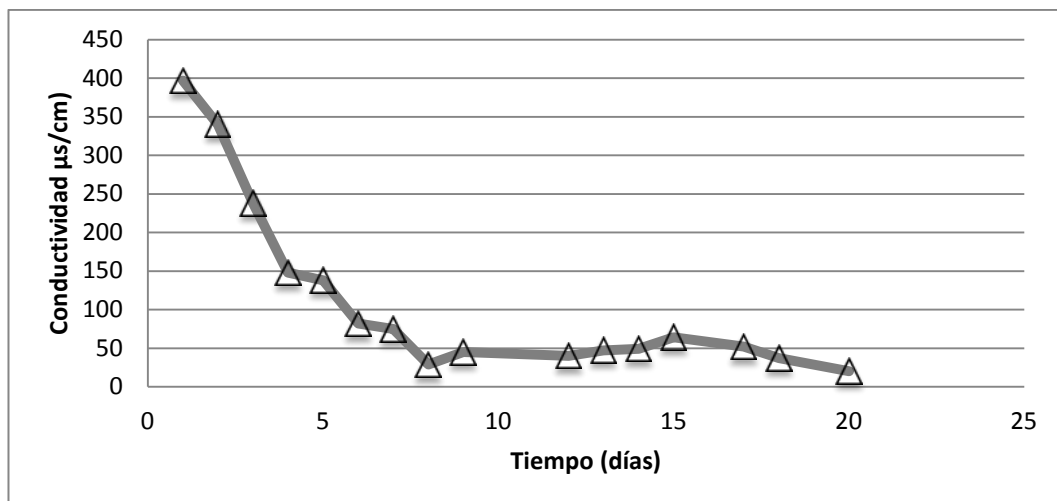
5.2.2 Diálisis

Después de obtener la dispersión homogénea preconcentrada del polímero mediante ultrafiltración, se realizó un proceso de diálisis, en el cual se emplearon compartimentos cilíndricos de membranas de celulosa (Sigma Chemical Co), las cuales tienen la capacidad 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. Este proceso de purificación, se describe a continuación, en un esquema general de diálisis dado entre macromoléculas y moléculas pequeñas como el azúcar, disueltos en un medio acuoso:



Esquema 3. 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

Con el ánimo de hacer un control en el proceso de purificación del material polimérico, inicialmente se realizó una toma de las medidas de conductividad del agua recién depositada en el recipiente y del agua después de 12 horas de estar en dicho proceso. Posteriormente, se realizaron cambios periódicamente del agua externa hasta observar valores de conductividad constantes durante un tiempo de 20 días, tal y como se muestra a continuación en la gráfica 1.



Gráfica 1. Valores de conductividad del medio acuoso externo del proceso de diálisis para las soluciones poliméricas de PAM-18Na2

5.2.3 Liofilización

Con el fin de obtener el material polimérico PAM-18Na2 en estado sólido, una vez purificado por los procesos de ultrafiltración y diálisis, se llevó a cabo la separación de fases de la solución polimérica, a partir de la sublimación del solvente acuoso, empleando un equipo de liofilización marca Eyela, y para el cual se contrató la prestación del servicio con un laboratorio externo.

5.3 Caracterización de la sal sódica del poli(ácido maleico-*alt*-octadeceno) PAM-18Na2

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 correspondientes al grupo anhídrido que se transforma a grupos carboxilatos y ácidos carboxílicos. Para esto se empleó un espectrofotómetro FTIR marca thermo fisher scientific nicoleet 6700, el cual cuenta con el software OMNIC para el tratamiento de los datos y el análisis de los espectros obtenidos.

5.3.1 Caracterización morfológica del estado sólido de los materiales de estudio

Debido a que la solubilidad de 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 especificaciones de los productos, se hace necesario realizar una caracterización general de dicha propiedad, para lo cual 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.

5.4 Validación de una metodología analítica para la cuantificación de ampicilina trihidratada utilizando 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.²⁷ 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 a las condiciones especificadas. Para esto se determinaron algunos parámetros, tales como selectividad, linealidad, repetibilidad y precisión intermedia, con el fin de validar la metodología analítica mediante la técnica de espectroscopia UV, por medio de un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Por otro lado, la preparación de las disoluciones acuosas de ampicilina se realizaron, empleando una balanza analítica marca Radwag AS 220 con una capacidad máxima de 220,0 g, capacidad mínima de 10,0 mg, error máximo de una medición de 1,0 mg y margen de variación entre cada resultado de máximo 0,1 mg, previamente calibrada, micropipetas y balones volumétricos marca Brand, previamente calibrados. El agua utilizada para los procesos de disolución de la ampicilina corresponde a agua tipo 2, tal y 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 presentan en el anexo 1.

5.5 Estandarización de la metodología para los estudios de solubilidad

Con el ánimo 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, tales como agitación por movimiento angular, agitación orbital y finalmente con 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 orbitalaria, 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.

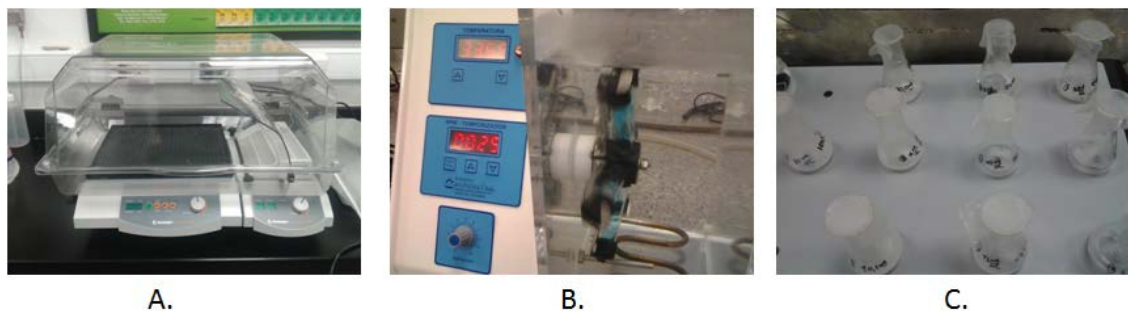


Imagen 4. Fotografías de los equipos utilizados para la saturación de fase acuosa de la ampicilina. A. equipo de agitación orbitalaria. B. equipo de agitación angular. C. equipo de agitación magnética

5.6 Ensayos de solubilidad del sistema de asociación fármaco (ampicilina)-polímero (PAM-18Na2)

Los ensayos de solubilidad se realizaron siguiendo metodologías previamente estandarizadas en el laboratorio de investigación. Inicialmente se determinó la concentración de saturación de la ampicilina trihidratada a 37,0°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 termo-mecánica tipo orbitalaria utilizando un equipo marca Heildoph[®] unimax 1010 acoplado a un sistema de incubación Heildoph[®] 1000, con una velocidad de agitación de 350 rpm y a una temperatura de 37,0°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 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.

5.7 Tratamiento y análisis de datos

Cada medida de absorbancia determinada en los ensayos de saturación de fase líquida o solubilidad (S_0), fueron contrastados 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 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 bajo condiciones determinadas, 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 un parámetro 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 definido del 95% para este estudio), que hay efecto significativo en las variables estudiadas sobre el la solubilidad del principio activo en cuestión. Cada análisis estadístico se realizó por medio del programa Microsoft® Excel.

Este análisis se realizó comparando el sistema polimérico con respecto al ensayo control, teniendo en cuenta las variables presencia de polímero y medio acuoso, siguiendo el diseño experimental de la tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental usado para el análisis de los perfiles de disolución

Variable	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (+1)
Polímero	Ausencia	N/A	Presencia
Medio biorrelevante	Agua	Buffer pH: 1,2 con Im= 0,15 M	Buffer pH: 7,4 con Im= 0,15 M

Con base en el diseño presentado, el criterio de aceptación es el parámetro F. Es decir, si este valor calculado es mayor que el F tabulado, puede decirse, con un porcentaje de confianza del 95%, que hay efecto significativo en las variables estudiadas (presencia o ausencia del sistema polimérico, sobre la solubilidad de la ampicilina).

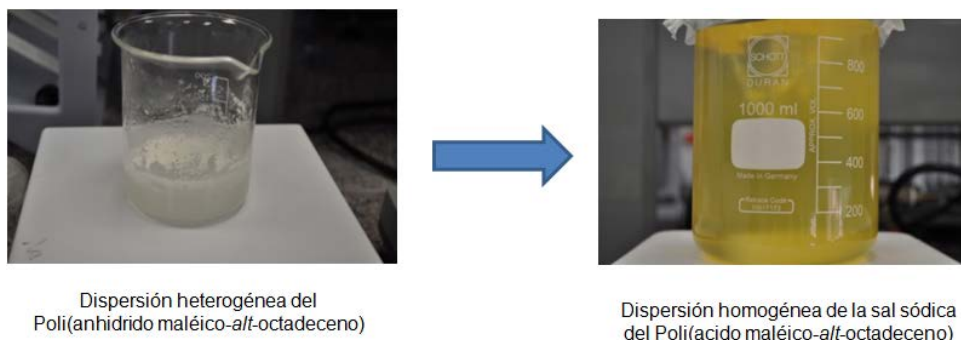
5.8 Preparación de los sistemas buffer

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 americana vigente (USP 35-NF 30, 2012), y se ajustó la fuerza iónica al valor requerido con cloruro de potasio (KCl) (Ver Anexo 4).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

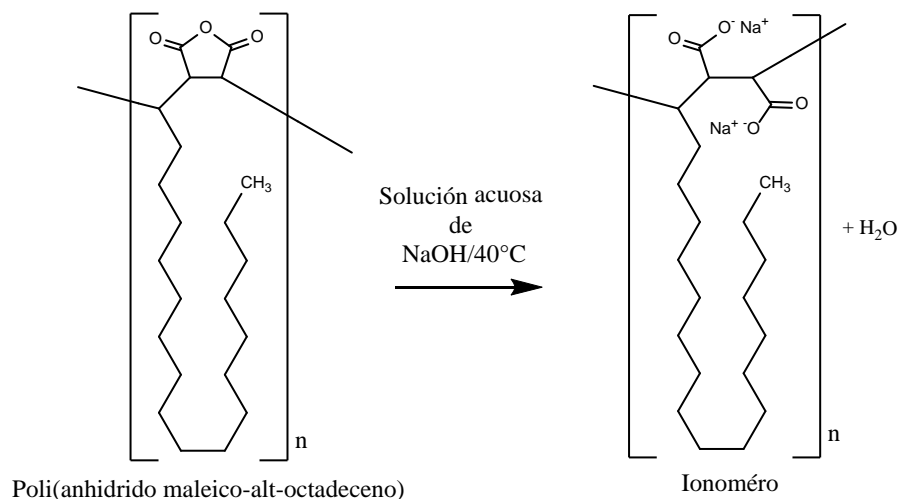
6.1 Obtención de la sal sódica del poli(ácido maléico-*alt*-octadeceno) PAM-18Na₂

De la manera en la que se mencionó anteriormente en el apartado metodológico, la preparación del material polimérico se realizó a partir del copolímero comercial poli(anhídrido maleico-*alt*-octadeceno), el cual se utilizó sin ulterior purificación y el cual se dispersó en agua, formando un sistema de dos fases, que posteriormente se transformó en un sistema disperso completamente homogéneo, tal como se muestra a continuación en el esquema 4.



Esquema 4. Proceso de hidrólisis en medio acuoso, necesario para la obtención del sistema ionomérico PAM-18Na₂

La obtención de un sistema homogéneo, a partir de un sistema heterodisperso inicial, puede explicarse gracias al rompimiento del grupo anhídrido, que genera grupos funcionales correspondientes a ácidos carboxílicos a lo largo de la cadena principal polimérica, los cuales son convertidos posteriormente a sus formas de carboxilatos, que genera el sistema ionomérico, y que resulta ser más soluble en dicho medio, debido a las interacciones de tipo ión-dipolo que se generan entre la macromolécula y el medio acuoso. A continuación se presenta el esquema general del proceso de hidrólisis básica, en el cual se empleó hidróxido de sodio para la formación del polímero iónico (Ionómero).



Esquema 5. Formación del ionómero sal sódica del PAM-18Na₂

Una vez hidrolizado y purificado el material polimérico PAM-18-Na₂ por los procesos de diálisis y liofilización, tal como se definen en la parte metodológica, se procedió a caracterizar dicho material polimérico en estado sólido, por medio de espectroscopia de FTIR. Para esto se obtuvieron los espectros tanto del material de partida como del producto obtenido, tal y como se muestra a continuación en la imagen 5.

A partir de los espectros IR que se muestran en la imagen anterior, se pueden

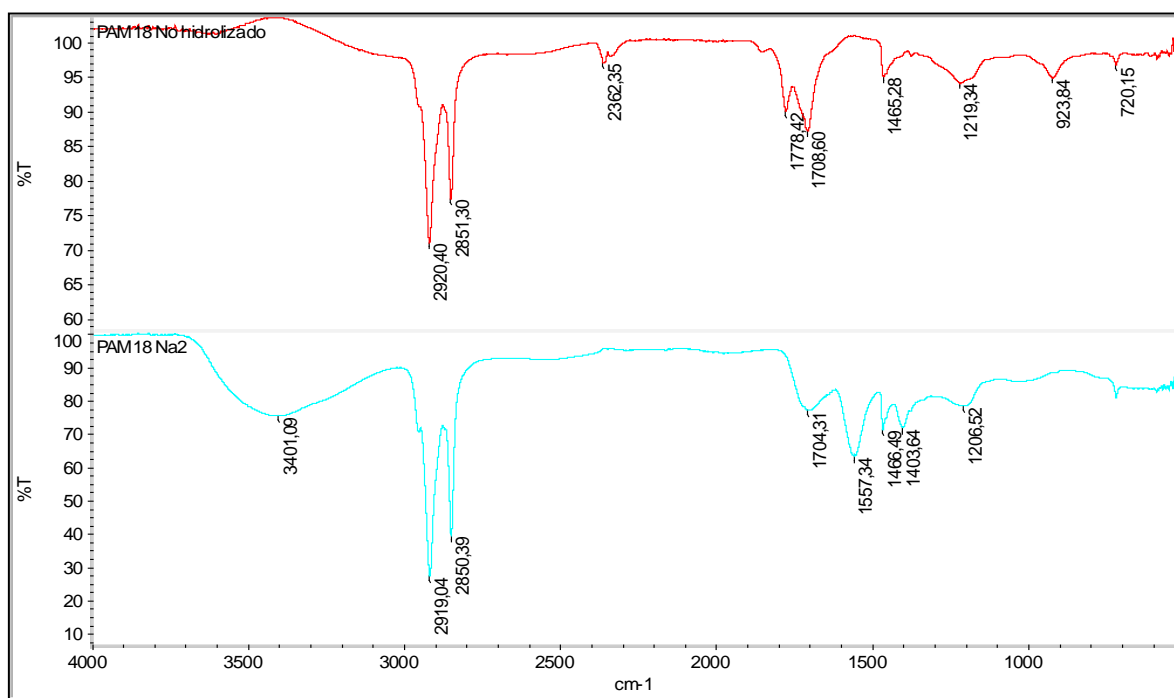


Imagen 5. Espectros IR de los materiales poliméricos poli(anhídrido maléico-alt-octadeceno) (línea roja) y la sal sódica del poli(ácido maléico-alt-octadeceno)(línea celeste)

observar las señales características para los grupos funcionales del material de partida y para el producto formado, tales como las bandas en 2920 y 2850 cm^{-1} , que corresponden a estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C-H de la cadena hidrocarbonada, los cuales se pueden corroborar además, con la señales alrededor de $1465\text{-}1466\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la torsiones CH_2 tipo tijeras. Estas señales permanecen muy similares en ambos espectros, dado que la cadena lateral polimérica correspondiente al grupo octadeceno permanece inalterada en el proceso de hidrólisis. Sin embargo, si es posible observar cambios notorios en otras señales que indican una transformación del material polimérico; tales como la desaparición de la señal a 2362 cm^{-1} en el material polimérico de partida, la cual corresponde al enlace C-O-C del anhídrido maleico que es hidrolizado. Además, se puede observar una variación en las dos señales de los grupos carbonilos del anhídrido maleico de 1778 y 1708 cm^{-1} a 1704 y 1557 cm^{-1} . Finalmente, se puede observar la aparición de una banda a 3401 cm^{-1} , que es un indicativo de la presencia de un grupo hidroxilo, proveniente de la formación de grupos ácido carboxílicos. Esto último es un indicativo de que el procesos de hidrólisis no es 100% , con lo cual se pueden tener fracciones de la forma acida y iónica del material polimérico, la cual deberá ser mejor caracterizada en futuros estudios.

6.2 Descripción de la morfología externa general de los materiales de estudio en estado sólido.

Como se mencionó en la parte metodológica, 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 deben 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 utilizada, así como del poli(anhídrido maleico-alt-octadeceno) y la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-octadeceno) obtenidas bajo las condiciones especificadas para los ensayos.

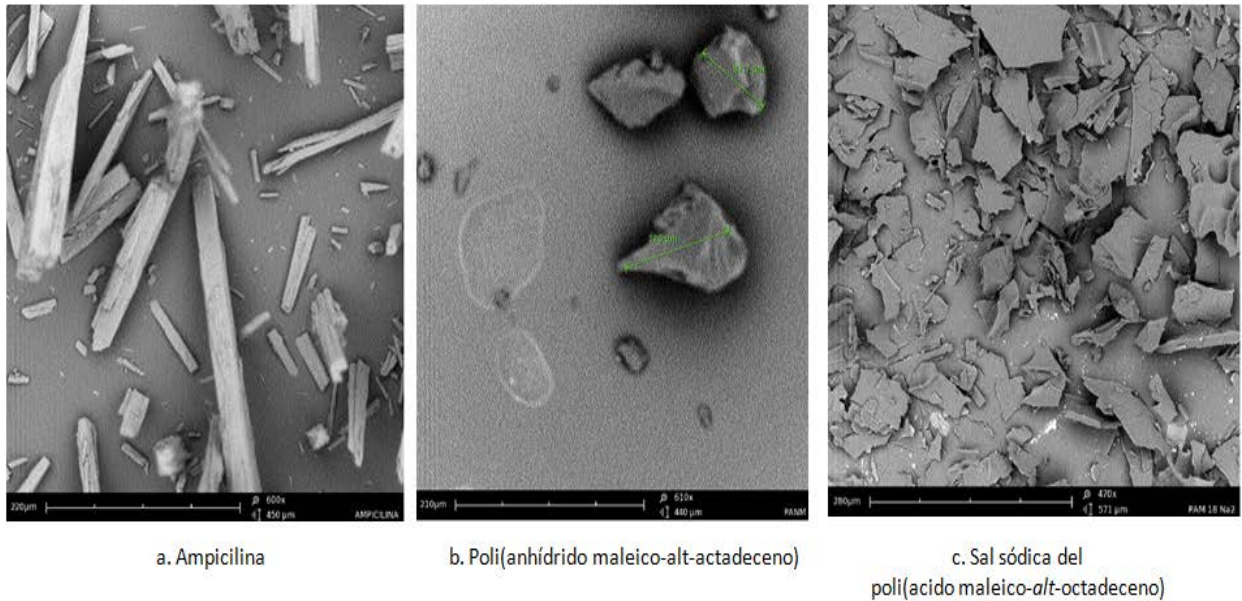


Imagen 6. Fotografías de escaneo electrónico para el fármaco y los materiales poliméricos de estudio

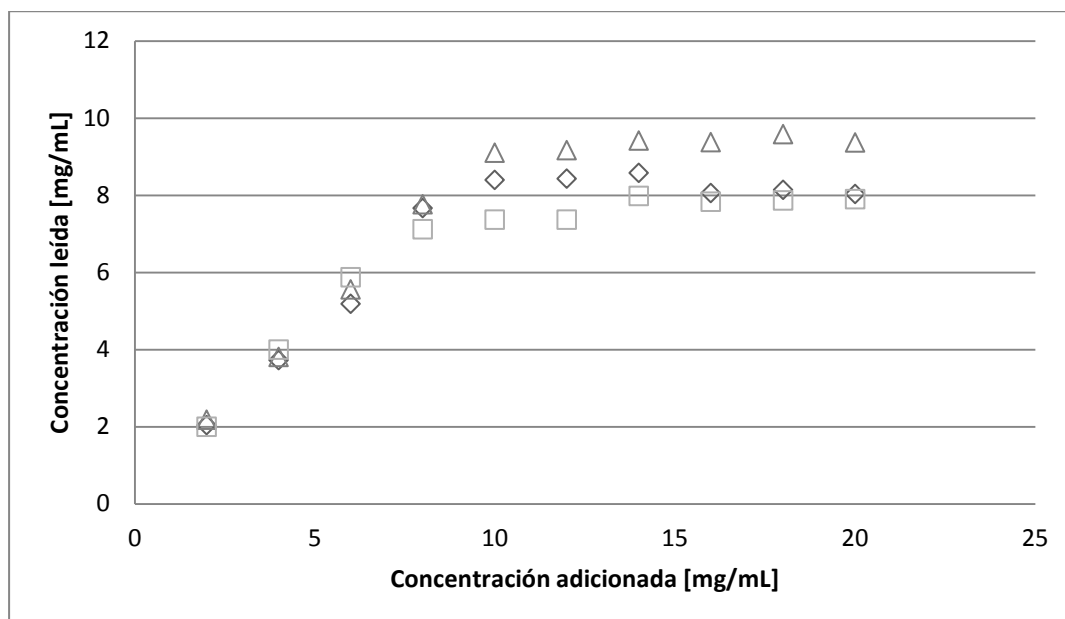
De la imagen anterior se aprecia que la ampicilina utilizada en nuestro estudio tiene una morfología de agujas. Mientras que los materiales poliméricos poli(anhídrido maleico-alt-octadeceno) y la sal sódica del poli(ácido maleico-alt-octadeceno) presentan formas rómbicas y de placas, respectivamente.

6.3 Estandarización de la metodología de agitación para los estudios de solubilidad de la ampicilina en medios acuosos biorreleventes.

6.3.1 Efecto de la forma de agitación sobre el perfil de saturación de fase acuosa de la ampicilina a 37,0°C.

La evaluación de la metodología más óptima para realizar los ensayos de determinación de solubilidad intrínseca de la Ampicilina trihidratada en medio acuoso, se realizó utilizando tres equipos con formas de agitación diferente, tales como agitación por movimiento angular, agitación orbital y agitación magnética tradicional. Inicialmente, se evaluaron los perfiles de saturación de fase líquida por parte de la ampicilina trihidratada en los medios biorreleventes de estudio, los cuales corresponden a agua purificada tipo II, solución buffer con valor de pH: 7,4 y fuerza iónica de 0,15 M y solución buffer con valor de

pH: 1,2 y fuerza iónica de 0,15 M. Estos perfiles se muestran a continuación en la gráfica 2.

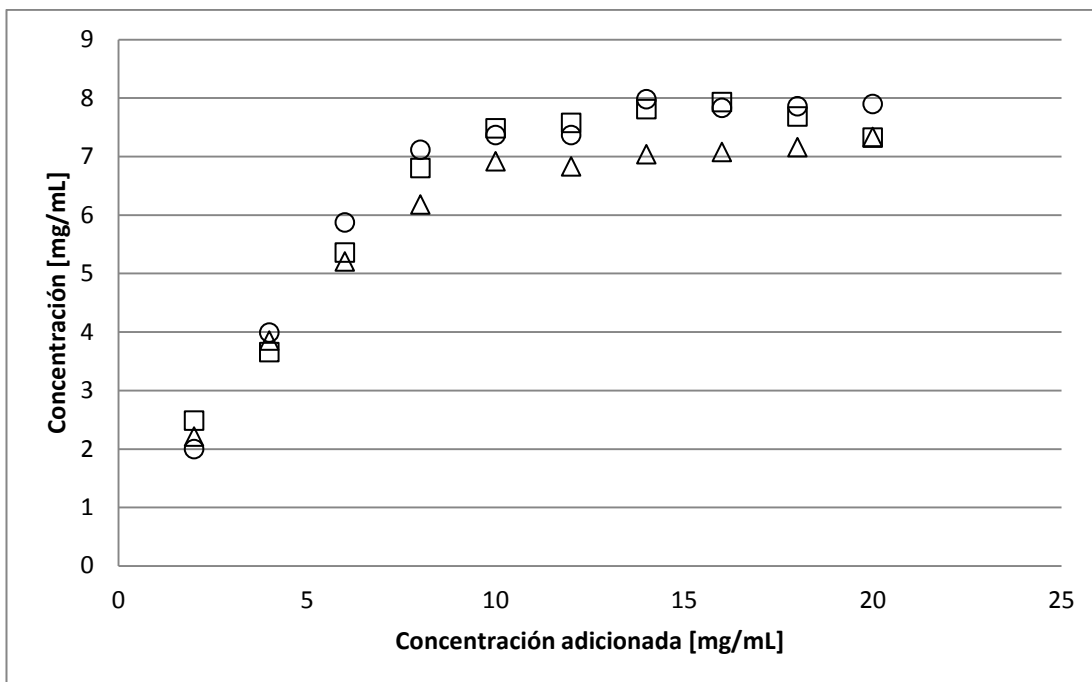


Gráfica 2. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en medio acuoso a una temperatura de 37,0°C; empleando tres métodos de agitación: (Δ) Agitación magnética, (\diamond) Agitación angular y (\square) Agitación orbital

La gráfica anterior muestra que la tendencia de saturación de la fase líquida acuosa por parte de la ampicilina trihidratada a una temperatura de 37.0°C, es similar para las tres metodologías utilizadas. Sin embargo, debido a que el equipo de agitación orbital tiene una mayor capacidad, para ensayar más muestras por cada estudio, se escogió dicha metodología para realizar los siguientes ensayos.

6.3.2 Efecto de la velocidad de agitación orbital sobre el perfil de saturación de fase acuosa de la ampicilina a 37,0°C.

Para este ensayo se evaluó la velocidad de agitación del equipo Heidolph® - unimax, para agitación orbital, para el cual se evaluaron tres velocidades correspondientes a 200, 350 y 500 rpm, tal como se muestra a continuación en la gráfica 3.

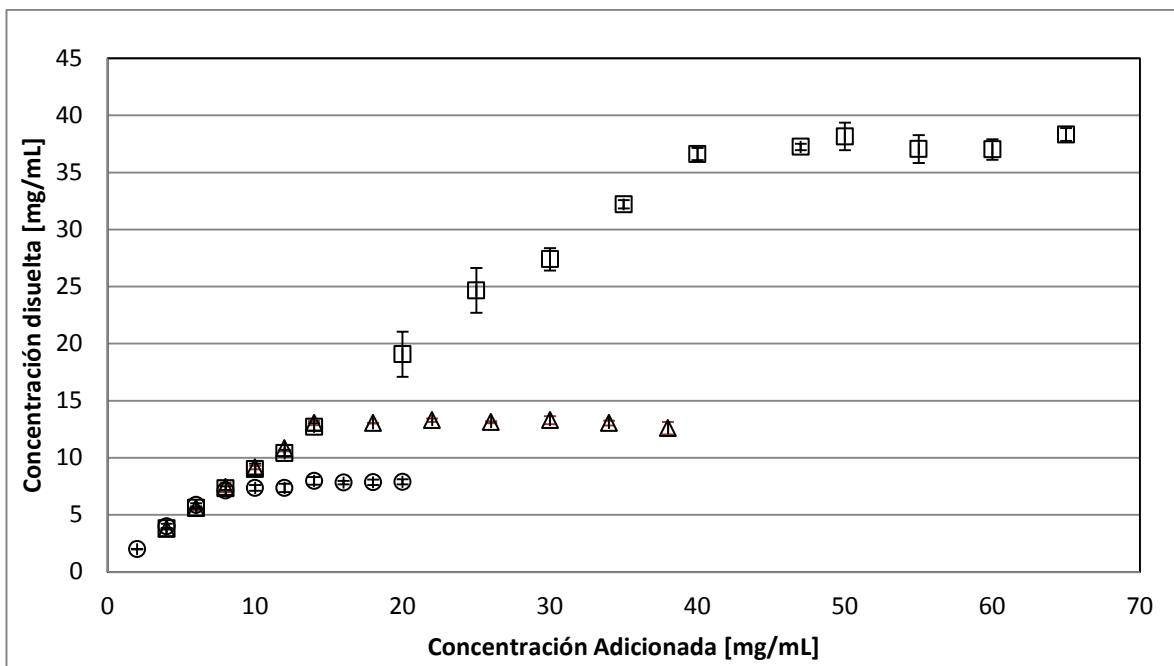


Gráfica 3. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en medio acuoso a 37 °C de temperatura, utilizando tres velocidades de agitación orbitalaria. (Δ) 200 rpm, (\circ) 350 rpm y (\square) 500 rpm

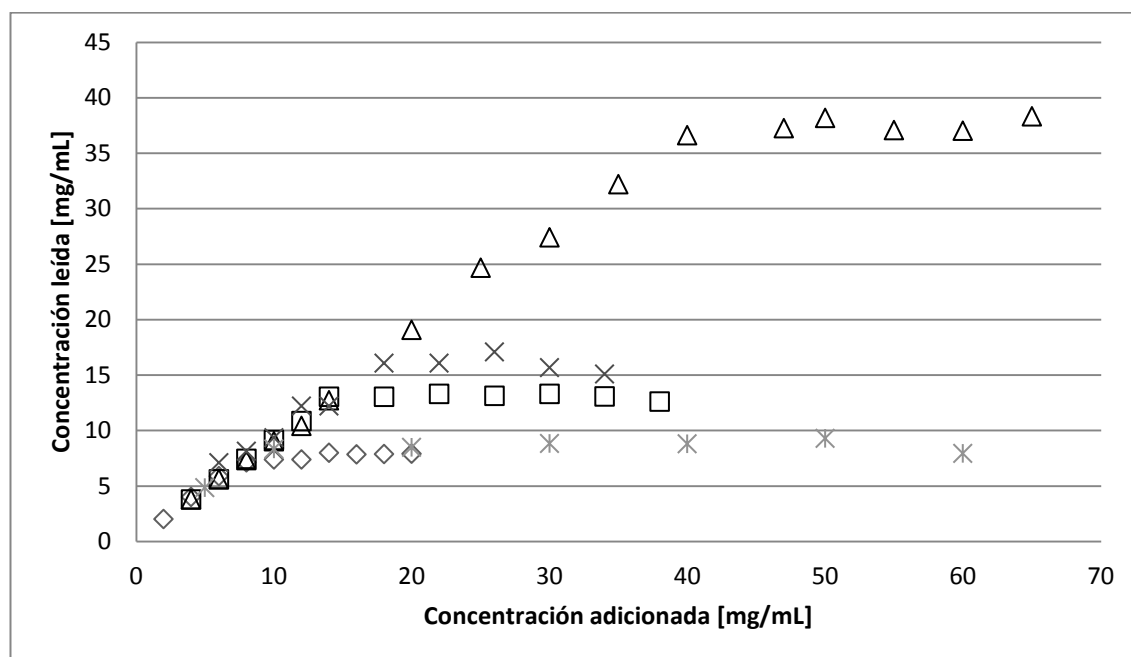
La gráfica nos muestra que resulta prácticamente la misma tendencia en los perfiles de saturación de la fase acuosa por parte de la ampicilina trihidratada, siendo ligeramente mayor a velocidades de agitación de 350 y 500 rpm. Este resultado puede deberse, en términos termodinámicos, a que durante el incremento de la velocidad de agitación, se genera un mayor trabajo sobre el sistema, lo que facilita la disgregación de las partículas sólidas del principio activo, hasta la obtención de partículas cohesivas de menor tamaño, que posteriormente se dispersan en el medio correspondiente, lo que resulta en lo que se aprecia como una sola fase. Dado que no se observa una diferencia marcada entre las velocidades de agitación de 350 y 500 rpm como velocidad de agitación, para el resto de los ensayos realizados se empleó una velocidad de agitación orbital correspondiente a 350 rpm.

6.4 Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en los medios acuosos de estudio

Inicialmente, se evaluaron los perfiles de saturación de fase líquida por parte de la ampicilina trihidratada en los medios acuosos de estudio, los cuales corresponden a agua purificada tipo II, solución buffer con valor de pH: 7,4 y fuerza iónica de 0,15 M y solución buffer con valor de pH: 1,2 y fuerza iónica de 0,15 M. Estos perfiles se muestran a continuación en la gráfica 4.



Gráfica 4. Perfil de saturación de la ampicilina trihidratada en tres medios acuosos. (○) Agua pura tipo II, (△) medio buffer pH: 7,4 con $I_m=0,15$ M y (□) medio buffer pH: 1,2 con $I_m=0,15$ M, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37,0°C de temperatura

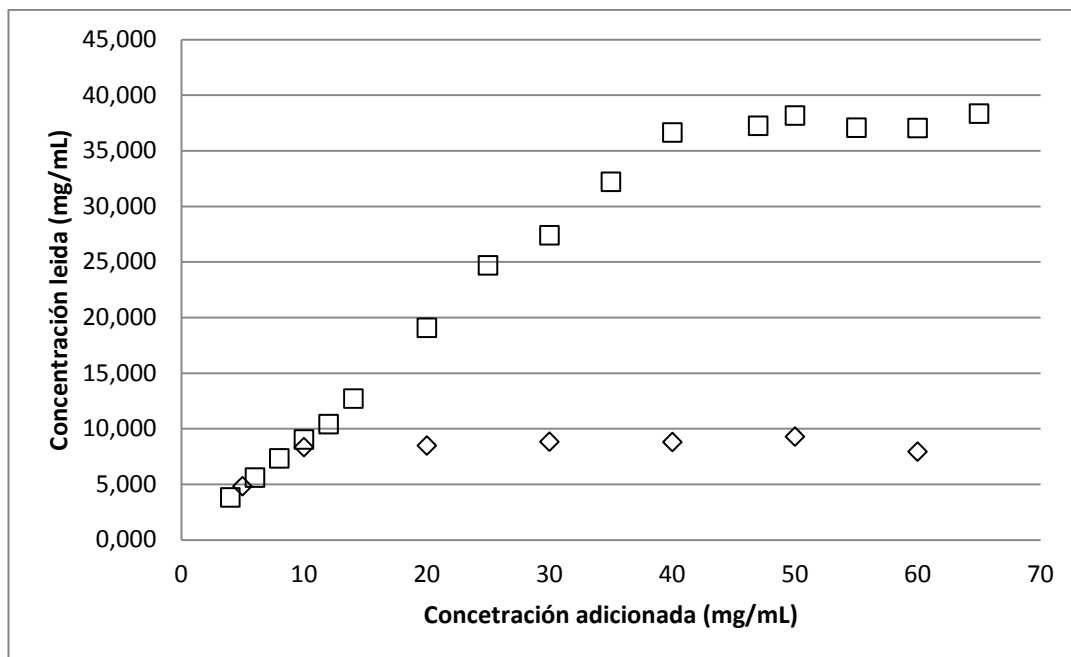


Gráfica 5. Efecto del medio acuoso sobre el perfil de saturación de fase acuosa de la ampicilina con y sin polímero a temperatura de 37,0°C. (◇) Agua tipo II; (□) solución buffer pH 7,4 sin polímero, con fuerza iónica de 0,15 M; (△) solución buffer pH 1,2 con polímero con fuerza iónica de 0,15 M; (x) solución buffer pH 7,4 con polímero, con fuerza iónica de 0,15 M; y (*) solución buffer pH 1,2 con polímero, con fuerza iónica de 0,15 M

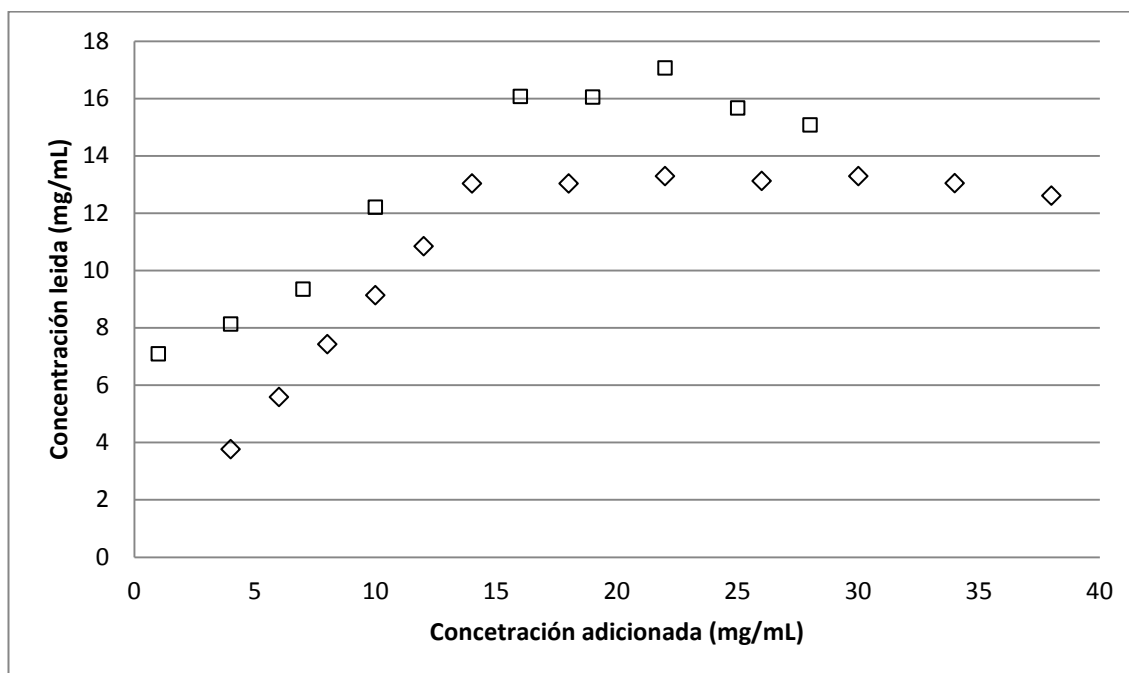
A partir de las gráficas anteriores, se puede observar una clara diferencia entre los perfiles de saturación de la fase líquida del medio acuoso por parte de la ampicilina trihidratada, donde se aprecia que para el medio correspondiente a agua pura, se obtiene una rápida saturación de la fase líquida con un valor extrapolado de concentración disuelta de 7,1133 mg/mL, mientras que para el medio buffer con valor de pH: 7,4; la saturación es ligeramente mayor con un valor de 13,0367 mg/mL; sin embargo, para el medio buffer con valor de pH: 1,2; se observa un mayor valor en la concentración disuelta de 36,6130 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 y del modelo simple de Henderson-Hasselbalch para sistemas de electrolitos potenciales en disolución²⁹. 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 electro-neutralidad, con lo cual la solubilidad de dicho soluto depende principalmente de interacciones moleculares tipo puente de hidrógeno. Por otro lado, cuando la ampicilina se encuentra en un medio con un valor de pH de 7,4; esta tiende aproximadamente a tener 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, lo cual también se ve manifestado en que en este medio ácido, se necesita mayor cantidad de fármaco para saturar el medio.

6.5 Ensayos de solubilidad del sistema de asociación fármaco (ampicilina)-polímero (PAM-18Na₂)

Una vez evaluados los perfiles de saturación de fase líquida de la ampicilina trihidratada en los diferentes medios acuosos, se procedió a evaluar el efecto de la incidencia del material polimérico PAM-18Na₂ 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; estos perfiles se muestran a continuación en las gráficas 6 y 7.



Gráfica 6. 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 37,0°C de temperatura. (□) Medio con PAM-18Na₂. (◇) Medio sin PAM -18Na₂



Gráfica 7. 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 37,0°C de temperatura. (◇) Medio con PAM -18Na₂. (□) Medio sin PAM -18Na₂

A partir de los gráficos dados en las gráficas 6 y 7, se puede observar una variación en los perfiles de saturación de la fase líquida del medio por parte de la ampicilina trihidratada, cuando se encuentra el material polimérico PAM - 18Na₂ en ambas condiciones de pH, siendo más marcada la variación del perfil a un valor de pH de 1,2; que a una 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 2 los datos de la cantidad de ampicilina disuelta en cada medio acuoso realizado en cada ensayo.

Tabla 2. Cantidad de ampicilina trihidratada disuelta en medios acuosos, utilizando un agitador orbitalario a 350 rpm y 37.0°C de temperatura

Sistema o Medio biorrelavante	Solubilidad intrínseca de ampicilina trihidratada			Promedio (mg/mL)	Desviación estándar
	(So1) (mg/mL)	(So2) (mg/mL)	(So3) (mg/mL)		
Agua purificada	7,054	7,161	7,125	7,1133	0,0544
Solución buffer pH:1,2 (Fuerza iónica: 0,15M)	36,613	36,072	37,154	36,6130	0,5410
Solución buffer pH:1,2 + PAM -18Na ₂	8,443	8,263	8,293	8,3330	0,0964
Solución buffer pH: 7,4 (Fuerza iónica: 0,15M)	12,903	13,170	13,037	13,0367	0,1335
Solución buffer pH: 7,4+ PAM -18Na ₂	16,613	15,978	15,610	16,0670	0,5074

El análisis de varianza realizado y que se muestra en el anexo 3, demostró que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para la solubilidad intrínseca de la ampicilina trihidratada en cada medio acuoso 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 la So para la ampicilina se dan cuando se utiliza el medio buffer 1,2; sin embargo cuando a este mismo medio se le adiciona el material polimérico PAM-18Na₂, se observa una gran disminución en la cantidad de saturación de la fase líquida por parte de la ampicilina trihidratada. Este efecto de disminución de la cantidad disuelta de la ampicilina cuando se encuentra el material polimérico, resulta muy interesante dado que se esperaría que dicho material polimérico se autorganizará en medio acuoso generando una pseudofase hidrófoba en virtud de sus grupos funcionales con baja polaridad, con lo cual se produjera una diferencia de potenciales químicos entre el medio acuoso y la pseudofase polimérica y con ello, que la ampicilina trihidratada migrara en forma espontánea hacia dicha fase incrementando su solubilidad en el sistema de

mezcla. Sin embargo, 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. 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, muy posiblemente podríamos estar frente a un efecto de disminución en la velocidad de disolución y no necesariamente de la solubilidad de la ampicilina.

Por otro lado, cuando la ampicilina se encuentra en un medio buffer con valor de pH de 7,4 en presencia del material polimérico, se observa un ligero incremento en la solubilidad pasando de $13 \pm 0,1$ mg/mL a $16 \pm 0,5$ mg/mL, este efecto se puede explicar teniendo presente que el material polimérico anfifílico se auto organizó en medio acuoso generando una pseudofase hidrofóbica en el medio acuoso, donde se pueda asociar a la ampicilina incrementando su valor de solubilidad.

7. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la síntesis, purificación y caracterización tanto fisicoquímica, como morfológica del polímero PAM-18Na₂, la cual se evidenció mediante espectroscopía ultravioleta e infrarroja, además de microscopía electrónica.

El proceso de obtención del polímero PAM-18Na₂ no es altamente eficaz, ya que en la caracterización estructural realizada por espectroscopia IR, se observó la presencia de un grupo funcional hidroxilo, proveniente de una función ácido carboxílico que no se neutraliza totalmente.

Los parámetros obtenidos para la validación de la metodología analítica utilizada en la cuantificación del principio activo ampicilina trihidratada en los medios biorrelevados estudiados, muestran ser estadísticamente confiables, lo cual permite asegurar la veracidad de los datos obtenidos. Además, al cumplir con el parámetro de linealidad, se puede afirmar que la absorbancia obtenida, es proporcional a la concentración de fármaco adicionado.

De acuerdo a los resultados obtenidos de los parámetros de validación, se puede concluir que estos cumplen con las especificaciones establecidas para cada uno. Para el parámetro de la selectividad no se observó alteración o modificación en el pico correspondiente al analito de interés (ampicilina) cuando se sometía a condiciones de estrés, para la repetibilidad del método y del sistema, los porcentajes del coeficiente de variación fueron menores al 2,0% y finalmente para la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación aproximado a uno.

Las tres metodologías evaluadas para la saturación de fase de los medios acuosos por parte de la ampicilina trihidratada son estadísticamente similares, con lo cual, la metodología de agitación orbitalaria es la más apropiada porque permite utilizar más muestra en un mismo tiempo de estudio.

Los resultados encontrados al desarrollar la metodología, permitieron determinar que la ampicilina trihidratada es un principio activo cuya solubilidad viene determinada en función del pH del medio en el que se encuentre, disociándose fácilmente en pH ácido.

El material polimérico PAM-18Na₂ estudiado, afecta significativamente el perfil de saturación de fase líquida de la ampicilina trihidratada en los dos medios acuosos estudiados, siendo mucho más marcado el efecto cuando el sistema se encuentra a un valor de pH de 1,2 que 7,4 a fuerza iónica de 0,15 M.

8. RECOMENDACIONES

En relación al proceso de obtención de la sal disódicas del poli(ácido maléico-*alt*-octadeceno) no es del cien por ciento, lo cual se puede observar en el espectro FTIR del polímero hidrolizado, donde aparece una banda correspondiente a un OH de un grupo ácido carboxílico; se hace necesario profundizar más sobre acerca de las metodologías involucradas con el proceso de neutralización del polímero para la formación del material ionomérico.

La metodología analítica desarrollada en este proyecto para la cuantificación del principio activo ampicilina trihidratada, utilizando espectrofotometría UV, así como el método para realizar los estudios de solubilidad, son replicables y de acuerdo a los resultados, obtenidos demuestra ser útil para obtener perfiles de solubilidad en diferentes medios acuosos. No obstante, se debe tener en cuenta, la realización de más estudios de preformulación, para evaluar el efecto en un intervalo más amplio de pH, además de variar diversas concentraciones del polímero, sobre el perfil de saturación de la ampicilina trihidratada.

Cuando se dé inicio al estudio de solubilidad con antibióticos, se recomienda realizar previamente estudios de estabilidad, con el fin de conocer las condiciones fisicoquímicas bajo las cuales el fármaco es menos estable, causando por ejemplo, la formación de productos de degradación; además, dicha información será de utilidad para llevar a cabo el diseño de la metodología y de las condiciones bajo las que se realizarán los estudios posteriores.

9. BIBLIOGRAFÍA

Sussmann, A., Mattos, L., Restrepo, A., (2002). Resistencia bacteriana. Revista Universitas Médica 43. (1)

Medina Landaeta, A. E. (2011). *Resistencia antimicrobiana en aislados de Escherichia coli de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina*. Universidad Complutense de Madrid, Tesis Doctoral. (2)

Departamento de Biología Molecular. *Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana*. Salud pública mexicana, 1998; 36 (4):428-438. (3)

Olaya, E., García, R., Torres, N., Ferro, N., Torres, S., Caracterización del proceso productivo, logístico y regulatorio de los medicamentos. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 2006; 13 (2): 69-82. (4)(5)(6)

Salamanca Mejía, C. M., (2007). Capítulo II: Obtención de sales poliméricas derivadas de anhídrido Maleico. Universidad de Chile. Tesis doctoral. (7) (16) (23) (24) (25) (26)

Salamanca Mejía, Constain Hugo. Diseño de una potencial forma farmacéutica de ampicilina, útil frente a microorganismos productores de betalactamasas (2007). Estado del arte marco teórico. (8) (14)

Kfoury, S., Araj G., Recent Developments in β Lactamases and Extended Spectrum β Lactamases, 2003; 327(7425):1209-1213. (9) (10) (11)

Moghadam, P., Azaryan, E., Zeynizade, B., (2010). Investigation of Poly(styrene-alt-maleic anhydride) Copolymer for Controlled Drug Delivery of Ceftriaxone Antibiotic. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 47(8), 839-848. (12)

Rang H., Dale M., (2008). *Farmacología de Rang y Dale*. Barcelona: Elsevier. 662-664. (13)

Salamanca Mejia C, Barraza Raúl g., Acevedo Betsabé, Olea Andrés f., Hydrophobically modified polyelectrolytes as potential drugs reservoirs of n-alkyl-nitroimidazoles (2007), Santiago de Chile. (15)

Hernández E., Claverie A., Cornejo J., Arndt K. Synthesis and polymerization of carboxyalkylmethacrylates: new hydrophobic polyelectrolytes. Designed monomes and polymers, 2001; 4 (4): 343-356. (17)

Salamanca Mejía, Constaín Hugo. Introducción a sistemas microheterogéneos formados por poli-electrolitos (2007). Capítulo I. (18)

Chávez J., Wong J., Jovanovic A., Sinner E., Duran R. Encapsulation in sub-micron species: a short review and alternate strategy for dye encapsulation. Chemistry Department, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA. 2005; 152(2):73-84. (19)

Albertsson, A.-C., & Karlsson, S. (1989). 13 - Biodegradable Polymers. In A. Editor-in-Chief: Sir Geoffrey (Ed.), *Comprehensive Polymer Science and Supplements* (pp. 285-297). Amsterdam: Pergamon. (20)

Kwon, G. S., & Okano, T. (1996). Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21(2), 107-116. (21)

Kwon GS. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2003;20:357–03. (22)

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. (26)

Aguilar G., Alcántara A., Chárvel A., García J., Garzón A., Guerrero M., et al. (1992) Validación de métodos analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos, México AC. (27)

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. (28)

Valsecia M. (2010). *Farmacología general: Farmacocinética* 1 (2). 18-19. (29)

ANEXO 1: Validación de una metodología analítica para la cuantificación de ampicilina trihidratada utilizando el espectrofotómetro UV.

A.1.1 Selectividad

Especificación: El parámetro de selectividad cumple si las interferencias, impurezas o posibles productos de degradación en la solución afectan la señal del analito.

Para el ensayo de selectividad se realizó inicialmente un barrido espectral desde 200,00nm hasta 800,00 nm para los dos medios buffer a pH 1,2 y pH 7,4 con una fuerza iónica (μ) igual a 0,15 mol/L.

Debido a que no se observa entre 400,00 y 800,00nm una absorción importante en ninguno de los espectros obtenidos, se muestra a continuación cada espectro desde 200 a 400nm (Imagen 7).

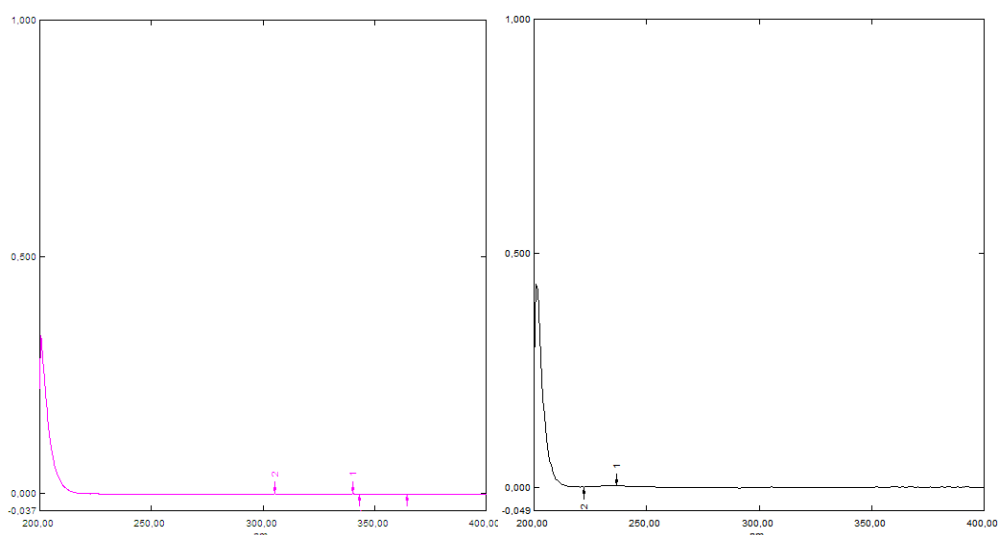


Imagen 7. Espectros UV de los sistemas buffer pH 1,2 (izquierda) y pH 7,4 (derecha) con fuerza iónica (μ) de 0,15 mol/L en ausencia del antibiótico

Para determinar el barrido de la ampicilina, en la forma trihidratada y en la forma sódica, se preparó una solución de 0,6 mg/mL en los sistemas buffer tanto a pH 1,2 como a 7,4; con una fuerza iónica (μ) de 0,15 mol/L, pesando 15 mg del compuesto y llevando a 25 mL con buffer a 37,0°C, e inmediatamente se llevó al espectrofotómetro, y se obtuvieron los espectros presentados en las imágenes 8 y 9.

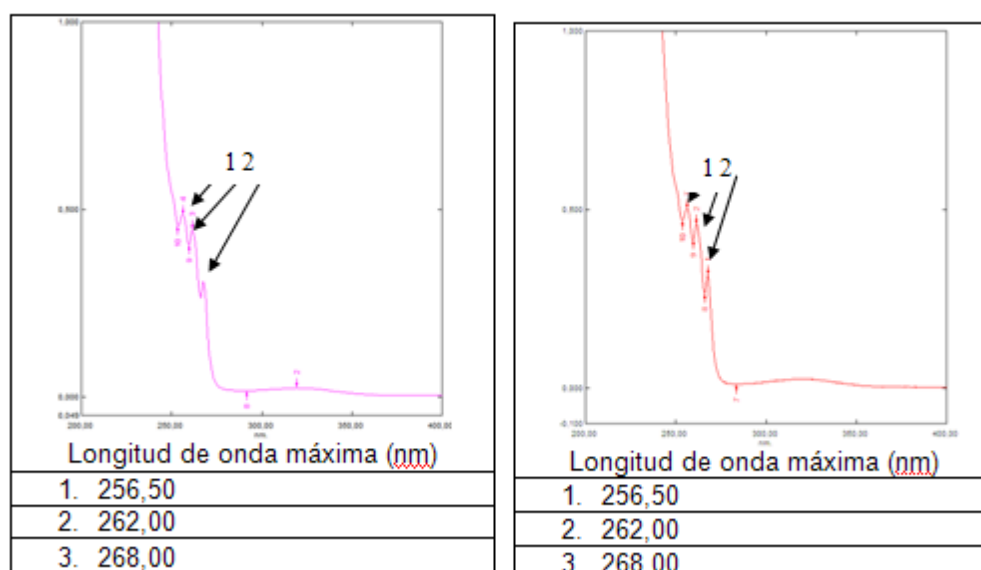


Imagen 8. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) recién preparadas en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M

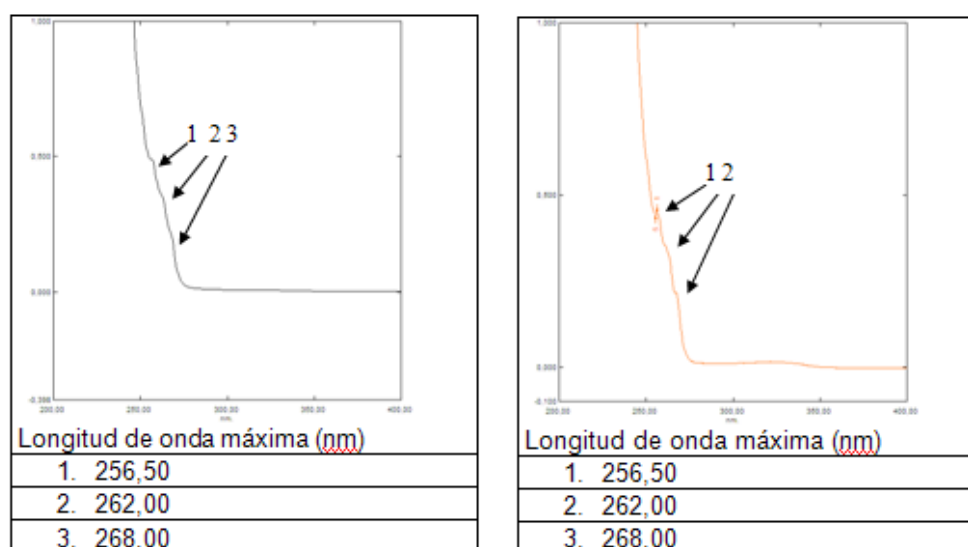


Imagen 9. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) recién preparadas en buffer pH 7,4 y μ 0,15 M

Posteriormente, las muestras de ampicilina sódica y trihidratada se expusieron a condiciones de estrés para acelerar su degradación, y determinar si hay algún pico dentro del barrido que corresponde a algún producto de degradación de la ampicilina. En la tabla 3 se presentan las condiciones de estrés empleadas para cada fármaco.

Tabla 3. Condiciones de estrés utilizadas para cada fármaco para evaluar su degradación

Fármaco	Ampicilina sódica		Ampicilina trihidratada	
pH	1,2	7,4	1,2	7,4
Fuerza iónica μ	0,15	0,15	0,15	0,15
Calentamiento	40°C	40°C	40°C	40°C
Agitación	Magnética	Magnética	Magnética	Magnética
Tiempo de exposición al calor	6 horas	10 horas	6 horas	6 horas
Tiempo de almacenamiento en nevera	63 horas	63 horas	63 horas	63 horas

Después de someter las muestras a condiciones de estrés de pH, temperatura y agitación, se les realizó un barrido para determinar la presencia de nuevos máximos de absorción. Los espectros obtenidos se muestran en las imágenes 10 y 11.

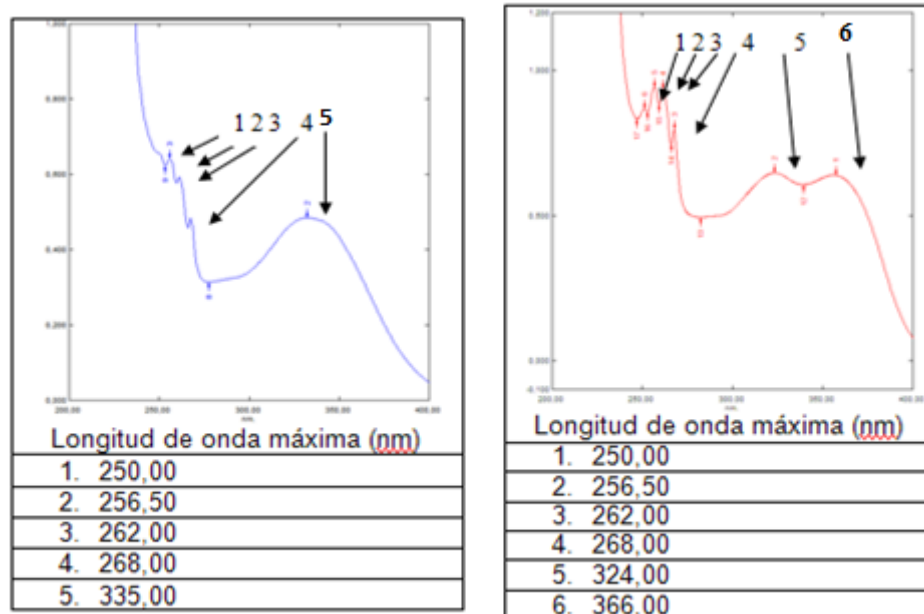


Imagen 10. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M bajo condiciones de estrés

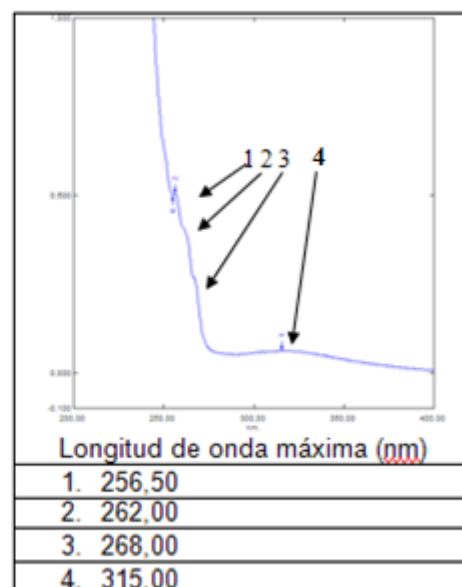
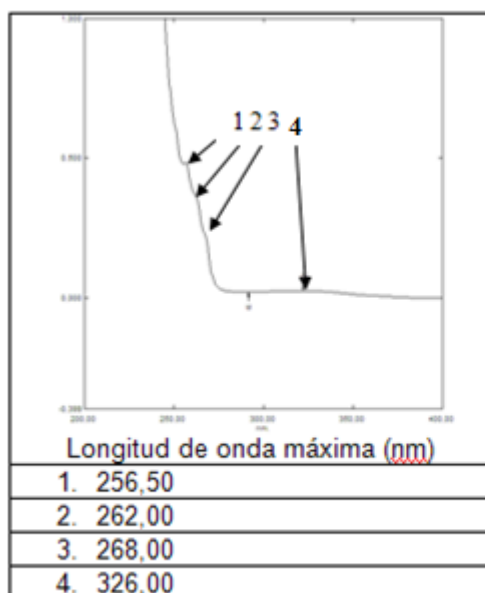


Imagen 11. Espectro UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 7,4 y μ 0,15 M bajo condiciones de estrés

Para determinar la longitud de onda óptima, se realizó un acercamiento a la región del espectro que permaneció constante en función del tiempo, que fue aproximadamente entre 240,00nm y 280,00nm.

Con base en las imágenes 12 y 13, puede decirse que la parte más constante del espectro se encuentra a 256,00nm (línea vertical), según la tendencia de los espectros obtenidos.

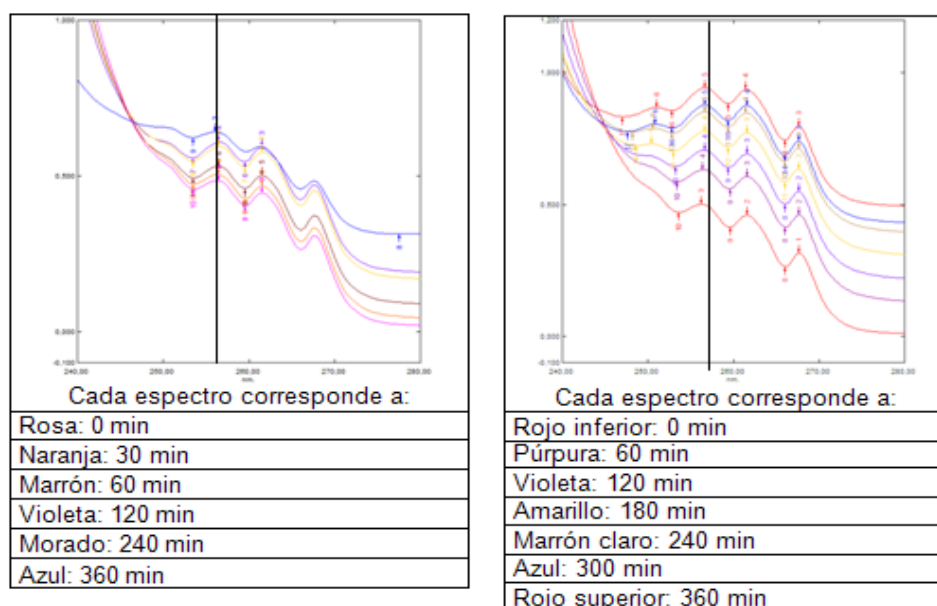


Imagen 12. Espectros UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M en función del tiempo bajo condiciones de estrés. La línea vertical negra corresponde a la longitud de onda adecuada para los ensayos (256,00 nm)

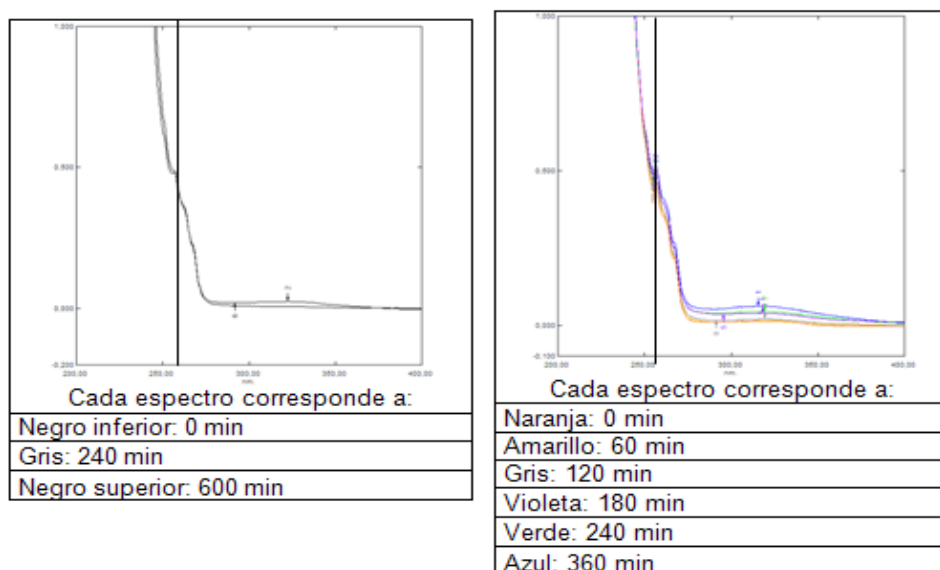


Imagen 13. Espectros UV de ampicilina sódica 0,6 mg/mL (izquierda) y ampicilina trihidratada 0,6 mg/mL (derecha) en buffer pH 1,2 y μ 0,15 M en función del tiempo bajo condiciones de estrés. La línea vertical negra corresponde a la longitud de onda adecuada para los ensayos (256,00 nm)

Se realizó además un barrido del buffer expuesto a las mismas condiciones de estrés, y se observó que no hay ningún cambio con respecto al buffer inicial.

Puede decirse a partir de estos resultados del principio activo sometido a condiciones de estrés, que al transcurrir el tiempo; para un valor de pH 1,2 hay nuevos máximos de absorción a 324,00nm y a 366,00nm; además, se presentó un hombro a 250,00nm para la ampicilina trihidratada, y un nuevo máximo a 335,00nm y se presentó un hombro a 250,00nm para la ampicilina sódica, fenómenos que presuntamente se deben a productos de degradación, mientras que el resto del espectro permaneció constante en comparación con el espectro para la muestra recién preparada. Para el caso del sistema a pH 7,4; se observó un aumento en la absorción a 236,00nm en ampicilina sódica, y para la ampicilina trihidratada se observó este mismo aumento a 315,00nm. Por tanto, para determinar la longitud de onda óptima, se realizó un acercamiento a la región del espectro, esto mostró que dicho valor permanece constante en función del tiempo a una longitud de onda de 256nm, y se encontraba aproximadamente entre 240,00nm y 280,00nm.

Según los resultados obtenidos, se puede afirmar que el método empleado es selectivo para el analito en estudio, que en este caso es la ampicilina trihidratada, ya que la señal en el espectro del fármaco no se ve afectada por interferencias o impurezas en la solución o posibles productos de degradación generados por las condiciones de estrés a las que se sometió.

A.1,2 Repetibilidad

A.1,2.1 Repetibilidad del método

Especificación: El parámetro de repetibilidad del método cumple si el porcentaje del coeficiente de variación de la absorbancia corregida se encuentra menor al 2,0%.

Se prepararon seis muestras de ampicilina trihidratada a una concentración de 0.6mg/mL y se llevó a balón volumétrico de 10 mL, se completó con agua destilada y se realizaron las seis lecturas en el espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 256 nm y a 37.0°C.

Nota: El procedimiento anterior se realizó igualmente para la solución buffer pH 1,2 y pH 7,4 a una temperatura de 37°C.

Tabla 4. Evaluación de la repetibilidad del método a diferentes medios

Medio: Agua	1	2	3	4	5	6	Promedio	DesvEst	%CV
Concentración real	0,580	0,580	0,600	0,600	0,600	0,580	0,590	0,011	1,857
Absorbancia	0,570	0,550	0,580	0,570	0,570	0,560	0,570	0,010	1,690
Absorbancia Corregida	0,590	0,570	0,580	0,570	0,570	0,580	0,580	0,007	1,244
Medio: Buffer pH 7,4	1	2	3	4	5	6	Promedio	DesvEst	%CV
Concentración real	0,600	0,560	0,600	0,600	0,600	0,620	0,597	0,020	3,296
Absorbancia	0,450	0,435	0,460	0,455	0,446	0,466	0,452	0,011	2,42
Absorbancia Corregida	0,450	0,466	0,460	0,455	0,446	0,451	0,455	0,007	1,614
Medio: Buffer pH 1,2	1	2	3	4	5	6	Promedio	DesvEst	%CV
Concentración real	0,580	0,600	0,620	0,620	0,580	0,600	0,600	0,018	2,981
Absorbancia	0,480	0,503	0,522	0,530	0,470	0,502	0,501	0,023	4,627
Absorbancia Corregida	0,497	0,503	0,505	0,513	0,486	0,502	0,501	0,009	1,791

Según los resultados obtenidos para la repetibilidad del método, se puede afirmar que el parámetro cumple con la especificación ya que los porcentajes del coeficiente de variación de la absorbancia corregida para el medio en agua, Buffer pH 7,4 y Buffer pH 1,2, son 1,244, 1,614, y 1,791 respectivamente.

A.1.2.2 Repetibilidad del sistema

Especificación: El parámetro de repetibilidad del sistema cumple si el porcentaje del coeficiente de variación se encuentra menor al 2,0%.

Para la evaluar la repetibilidad del sistema, se preparó una sola muestra de ampicilina trihidratada a una concentración de 0,6mg/mL, se llevó a balón volumétrico de 10mL, se completó con agua destilada y se realizaron 10 lecturas de la muestra en el espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 256nm y a 37.0°C. Los valores de absorbancia obtenidos para determinar este parámetro, se incluyen en la tabla 5.

Nota: El procedimiento anterior se realizó igualmente para la solución buffer pH 1,2 y pH 7,4 a una temperatura de 37°C.

Tabla 5. . Evaluación de la repetibilidad del sistema a diferentes medios

Longitud de onda 256nm			
Temperatura: 37.0°C			
Concentración: 0,6 mg/mL			
Número de repeticiones	Agua Absorbancia	Buffer pH 7,4 Absorbancia	Buffer pH 1,2 Absorbancia
1	0,552	0,437	0,520
2	0,552	0,437	0,520
3	0,552	0,437	0,520
4	0,552	0,437	0,520
5	0,552	0,437	0,520
6	0,552	0,437	0,520
7	0,552	0,437	0,520
8	0,552	0,437	0,520
9	0,552	0,437	0,520
10	0,552	0,437	0,520
Promedio	0,552	0,437	0,520
DesVest	$1,17028 \times 10^{-16}$	$5,85139 \times 10^{-17}$	$1,17028 \times 10^{-16}$
%CV	$2,12007 \times 10^{-14}$	$1,33899 \times 10^{-14}$	$2,25053 \times 10^{-14}$

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede decir que el parámetro de repetibilidad del sistema cumple con la especificación establecida, ya que los porcentajes del coeficiente de variación obtenido para los medios acuosos (agua, Buffer pH 1,2 y Buffer pH 7,4) son menores al 2,0%

A.1.3 Linealidad

Este parámetro se evalúa mediante la realización de curvas de calibración, tanto con ampicilina sódica, como trihidratada, con lo que se obtienen parámetros como R², intercepto y pendiente.

A.1.3.1 Preparación de las disoluciones acuosas de ampicilina sódica

Se pesó 25 mg de ampicilina sódica y se llevó a un balón volumétrico de 25 mL. Se aforó con solución de buffer pH 7,4. De esta solución se prepararon las diluciones a 1mg/mL; 0,7 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,3 mg/mL y 0,1 mg/mL. Se realizaron tres mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 256nm a

cada muestra a diferentes valores de temperatura: 25,0°C, 30,0°C, 35,0°C y 40,0°C.

Nota: El procedimiento anterior se realiza igualmente para la solución buffer pH 1,2.

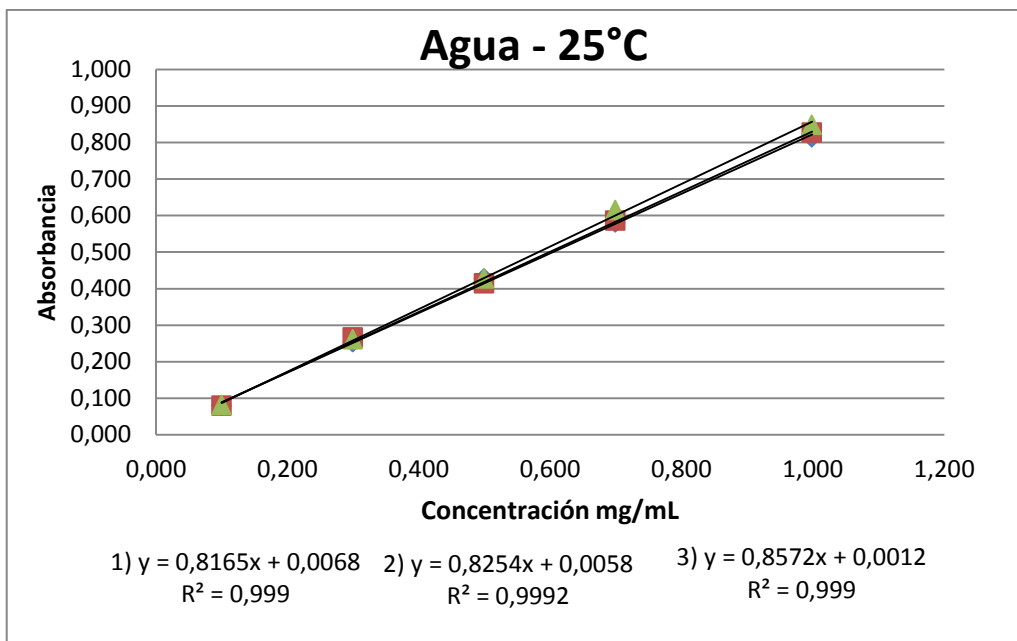
A.1.3.2 Preparación de las disoluciones acuosas de ampicilina trihidratada

Se pesó 25mg de ampicilina trihidratada y se llevó a un balón volumétrico de 25mL. Se aforó con solución de buffer pH 7,4. De esta solución se prepararon las diluciones a 1mg/mL; 0,7mg/mL; 0,5mg/mL; 0,3mg/mL y 0,1mg/mL. Se realizaron tres mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 256nm a cada muestra a diferentes valores de temperatura: 25,0°C, 30,0°C, 35,0°C y 40,0°C.

Nota: El procedimiento anterior se realizó igualmente para la solución buffer pH 1,2.

Tabla 6. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 25,0°C

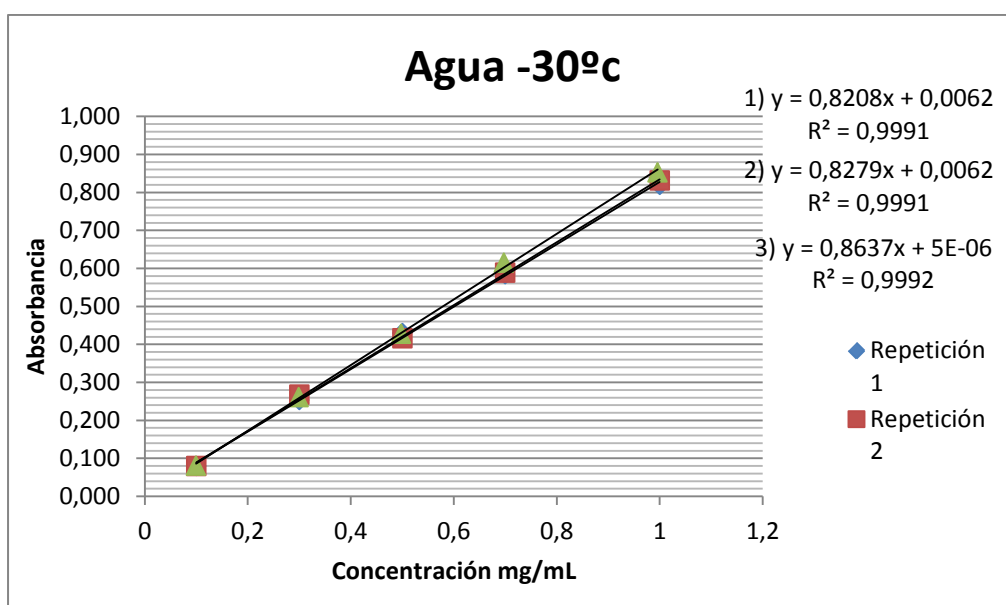
25.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0.1	0,079	0,079	0,079	0,079	0,00	0,00
0.3	0,253	0,253	0,253	0,253	0,00	0,00
0.5	0,427	0,427	0,427	0,427	0,00	0,00
0.7	0,581	0,581	0,581	0,581	0,00	0,00
1	0,814	0,814	0,814	0,814	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4308		
25.0°C Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,079	0,079	0,08	0,079	0,00	0,01
0,3	0,266	0,266	0,266	0,266	0,00	0,00
0,5	0,414	0,414	0,414	0,414	0,00	0,00
0,7	0,586	0,585	0,586	0,586	0,00	0,00
1	0,827	0,827	0,827	0,827	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4344		
25.0 °C Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,081	0,081	0,081	0,081	0,00	0,00
0,3	0,261	0,261	0,261	0,261	0,00	0,00
0,5	0,427	0,427	0,427	0,427	0,00	0,00
0,7	0,615	0,615	0,615	0,615	0,00	0,00
1	0,848	0,848	0,848	0,848	0,00	0,00



Gráfica 8. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 25,0°C

Tabla 7. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 30,0°C

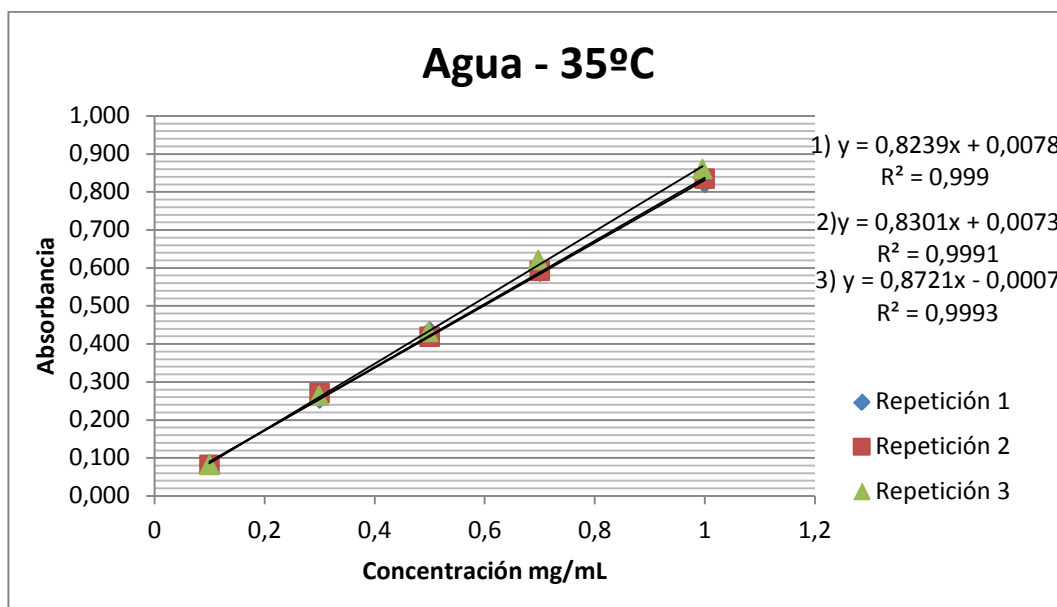
30.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,080	0,080	0,080	0,080	0,00	0,00
0,3	0,253	0,253	0,253	0,253	0,00	0,00
0,5	0,429	0,429	0,429	0,429	0,00	0,00
0,7	0,584	0,584	0,584	0,584	0,00	0,00
1	0,819	0,819	0,820	0,819	0,00	0,00
30.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,08	0,08	0,08	0,080	0,00	0,00
0,3	0,268	0,268	0,268	0,268	0,00	0,00
0,5	0,416	0,415	0,416	0,416	0,00	0,00
0,7	0,589	0,589	0,589	0,589	0,00	0,00
1	0,831	0,831	0,831	0,831	0,00	0,00
30.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,081	0,08	0,081	0,081	0,00	0,01
0,3	0,261	0,261	0,261	0,261	0,00	0,00
0,5	0,428	0,428	0,428	0,428	0,00	0,00
0,7	0,615	0,615	0,615	0,615	0,00	0,00
1	0,852	0,852	0,852	0,852	0,00	0,00



Gráfica 9. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 30,0°C

Tabla 8. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 35.0°C

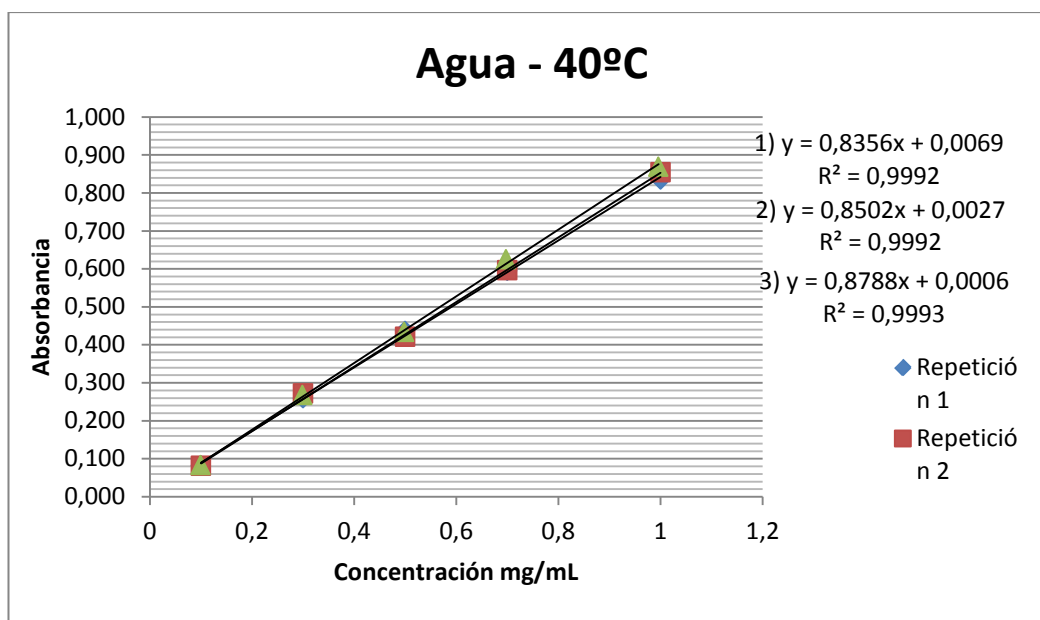
35.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,081	0,081	0,081	0,081	0,00	0,00
0,3	0,256	0,256	0,256	0,256	0,00	0,00
0,5	0,432	0,432	0,432	0,432	0,00	0,00
0,7	0,589	0,589	0,589	0,589	0,00	0,00
1	0,823	0,823	0,823	0,823	0,00	0,00
35.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,081	0,081	0,081	0,081	0,00	0,00
0,3	0,27	0,27	0,27	0,270	0,00	0,00
0,5	0,418	0,418	0,418	0,418	0,00	0,00
0,7	0,592	0,592	0,592	0,592	0,00	0,00
1	0,834	0,834	0,834	0,834	0,00	0,00
35.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,081	0,081	0,081	0,081	0,00	0,00
0,3	0,263	0,263	0,263	0,263	0,00	0,00
0,5	0,431	0,431	0,431	0,431	0,00	0,00
0,7	0,620	0,620	0,620	0,620	0,00	0,00
1	0,860	0,860	0,860	0,860	0,00	0,00



Gráfica 10. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 35,0°C

Tabla 9. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en agua a 40,0°C

40.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,082	0,082	0,082	0,082	0,00	0,00
0,3	0,259	0,259	0,259	0,259	0,00	0,00
0,5	0,436	0,436	0,436	0,436	0,00	0,00
0,7	0,595	0,595	0,595	0,595	0,00	0,00
1	0,835	0,835	0,835	0,835	0,00	0,00
40.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,081	0,081	0,081	0,081	0,00	0,00
0,3	0,272	0,272	0,272	0,272	0,00	0,00
0,5	0,421	0,421	0,421	0,421	0,00	0,00
0,7	0,596	0,596	0,596	0,596	0,00	0,00
1	0,854	0,854	0,854	0,854	0,00	0,00
40.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,083	0,083	0,083	0,083	0,00	0,00
0,3	0,267	0,267	0,2697	0,268	0,00	0,01
0,5	0,434	0,434	0,434	0,434	0,00	0,00
0,7	0,625	0,625	0,625	0,625	0,00	0,00
1	0,869	0,869	0,869	0,869	0,00	0,00



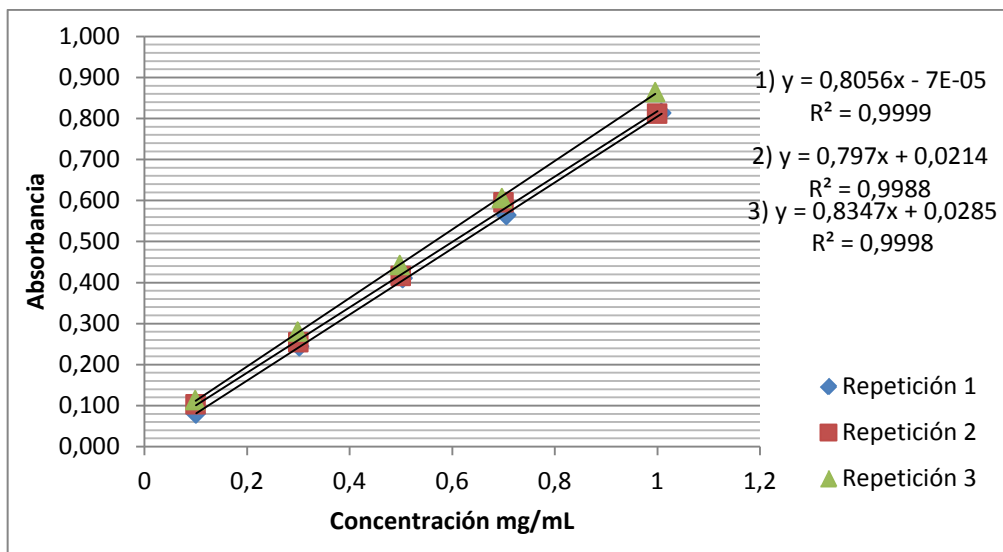
Gráfica 11. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en agua a 40,0°C

Tabla 10. Resultados de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para ampicilina en agua

Temperatura (°C)	Repetición	Intercepto	Pendiente	R ²
25,0	1	0,0068	0,8165	0,9990
	2	0,0058	0,8254	0,9992
	3	0,0012	0,8572	0,9990
30,0	1	0,0062	0,8208	0,9991
	2	0,0062	0,8279	0,9991
	3	5 x 10 ⁻⁶	0,8637	0,9992
35,0	1	0,0078	0,8239	0,999
	2	0,0073	0,8301	0,9991
	3	0,0007	0,8721	0,9993
40,0	1	0,0069	0,8356	0,9992
	2	0,0027	0,8502	0,9992
	3	0,0006	0,8788	0,9993

Tabla 11. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en Medio Buffer pH 1,2 a 25,0°C

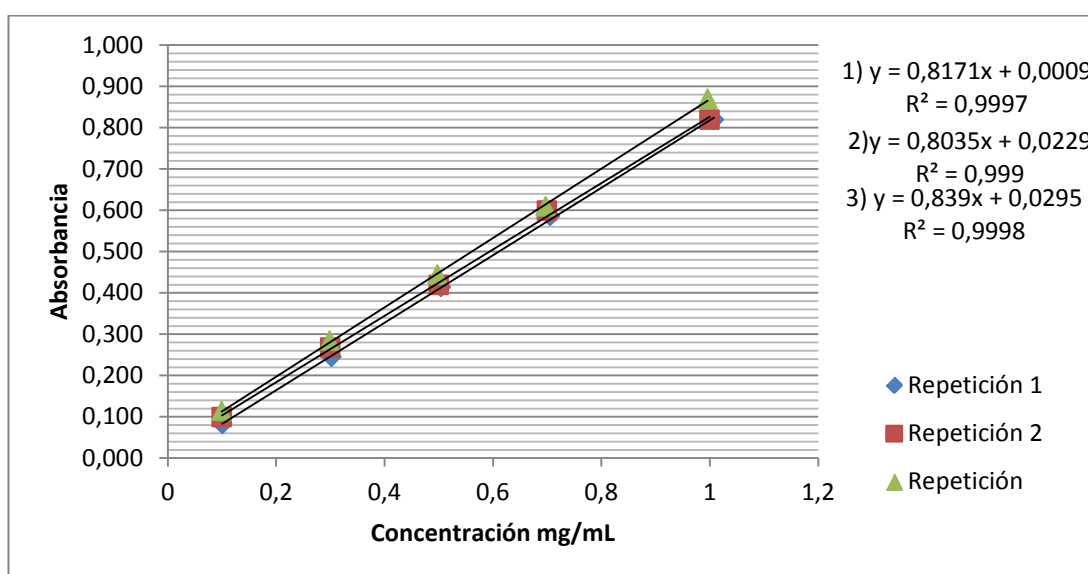
25.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,080	0,080	0,080	0,080	0,00	0,00
0,3	0,244	0,244	0,244	0,244	0,00	0,00
0,5	0,410	0,410	0,410	0,410	0,00	0,00
0,7	0,564	0,564	0,564	0,564	0,00	0,00
1	0,813	0,813	0,813	0,813	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4222		
25.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,103	0,103	0,103	0,103	0,00	0,00
0,3	0,254	0,254	0,254	0,254	0,00	0,00
0,5	0,416	0,416	0,416	0,416	0,00	0,00
0,7	0,595	0,595	0,595	0,595	0,00	0,00
1	0,811	0,811	0,811	0,811	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4358		
25.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,113	0,113	0,113	0,113	0,00	0,00
0,3	0,280	0,280	0,280	0,280	0,00	0,00
0,5	0,442	0,442	0,442	0,442	0,00	0,00
0,7	0,605	0,605	0,605	0,605	0,00	0,00
1	0,864	0,864	0,864	0,864	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4608		



Gráfica 12. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 25,0°C

Tabla 12. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada en Medio Buffer pH 1,2 a 30.0°C

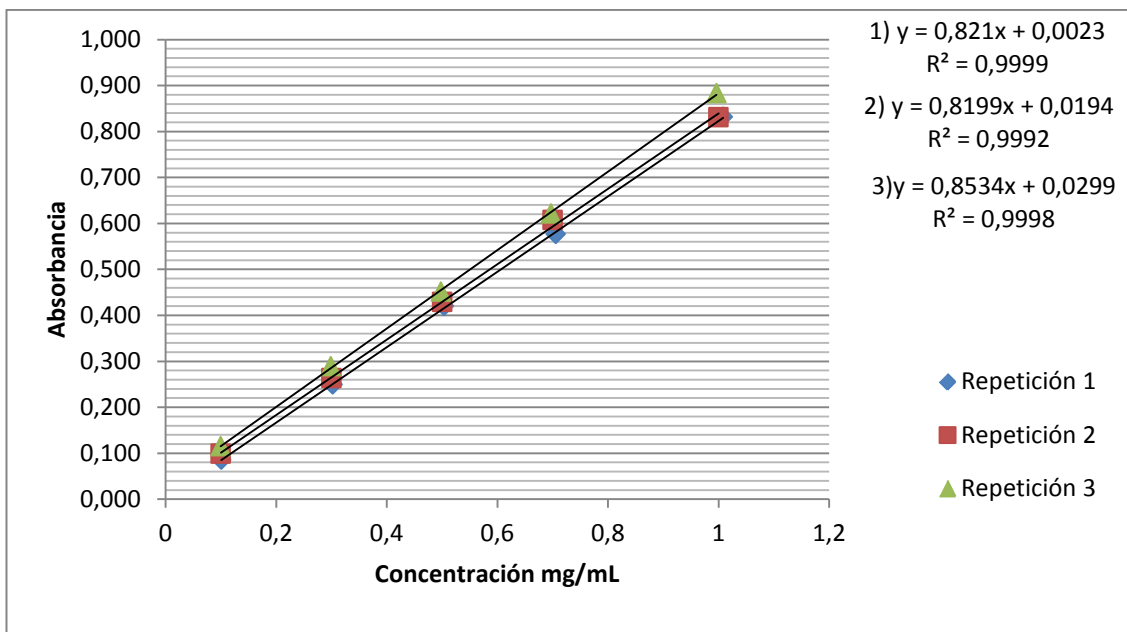
30.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,082	0,082	0,082	0,082	0,00	0,00
0,3	0,245	0,245	0,245	0,245	0,00	0,00
0,5	0,414	0,414	0,414	0,414	0,00	0,00
0,7	0,572	0,589	0,596	0,586	0,01	0,02
1	0,819	0,819	0,819	0,819	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4292		
30.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,099	0,099	0,099	0,099	0,00	0,00
0,3	0,256	0,257	0,29	0,268	0,02	0,07
0,5	0,419	0,419	0,419	0,419	0,00	0,00
0,7	0,599	0,599	0,599	0,599	0,00	0,00
1	0,819	0,819	0,819	0,819	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4408		
30.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,113	0,114	0,114	0,114	0,00	0,01
0,3	0,284	0,284	0,284	0,284	0,00	0,00
0,5	0,444	0,444	0,444	0,444	0,00	0,00
0,7	0,609	0,609	0,609	0,609	0,00	0,00
1	0,869	0,87	0,869	0,869	0,00	0,00
PROMEDIO				0.4640		



Gráfica 13. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 30,0°C

Tabla 13. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada
Medio Buffer pH 1,2 a 35,0°C

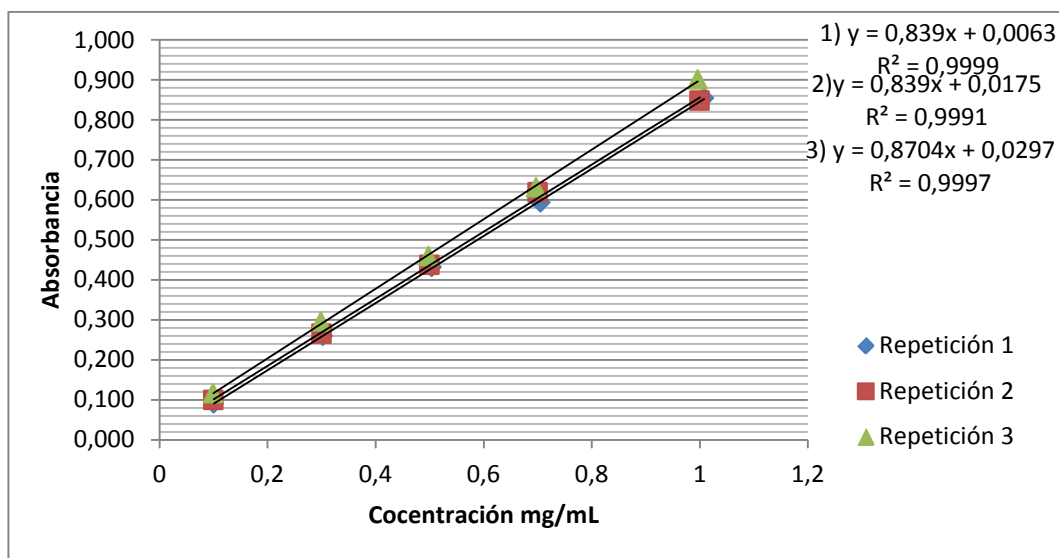
35.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,1	0,086	0,085	0,086	0,086	0,00	0,01
0,3	0,249	0,249	0,249	0,249	0,00	0,00
0,5	0,42	0,42	0,42	0,420	0,00	0,00
0,7	0,576	0,577	0,577	0,577	0,00	0,00
1	0,832	0,831	0,832	0,832	0,00	0,00
PROMEDIO				0,4328		
35.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,1	0,099	0,099	0,099	0,099	0,00	0,00
0,3	0,263	0,263	0,263	0,263	0,00	0,00
0,5	0,429	0,429	0,429	0,429	0,00	0,00
0,7	0,607	0,607	0,607	0,607	0,00	0,00
1	0,831	0,831	0,831	0,831	0,00	0,00
PROMEDIO				0,4458		
35.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	%CV
0,1	0,115	0,115	0,115	0,115	0,00	0,00
0,3	0,289	0,289	0,289	0,289	0,00	0,00
0,5	0,451	0,451	0,451	0,451	0,00	0,00
0,7	0,622	0,621	0,621	0,621	0,00	0,00
1	0,883	0,883	0,883	0,883	0,00	0,00
PROMEDIO				0,4718		



Gráfica 14. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 35,0°C

Tabla 14. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 1,2 a 40,0°C

40.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,091	0,091	0,091	0,091	0,00	0,00
0,3	0,26	0,26	0,26	0,260	0,00	0,00
0,5	0,432	0,432	0,432	0,432	0,00	0,00
0,7	0,593	0,594	0,594	0,594	0,00	0,00
1	0,854	0,854	0,854	0,854	0,00	0,00
PROMEDIO				0,4462		
40.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,1	0,1	0,1	0,100	0,00	0,00
0,3	0,265	0,265	0,265	0,265	0,00	0,00
0,5	0,437	0,437	0,437	0,437	0,00	0,00
0,7	0,619	0,619	0,619	0,619	0,00	0,00
1	0,848	0,848	0,848	0,848	0,00	0,00
PROMEDIO				0,4538		
40.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,116	0,116	0,117	0,116	0,00	0,00
0,3	0,296	0,295	0,295	0,295	0,00	0,00
0,5	0,459	0,459	0,459	0,459	0,00	0,00
0,7	0,631	0,631	0,631	0,631	0,00	0,00
1	0,901	0,901	0,901	0,901	0,00	0,00
PROMEDIO				0,4804		



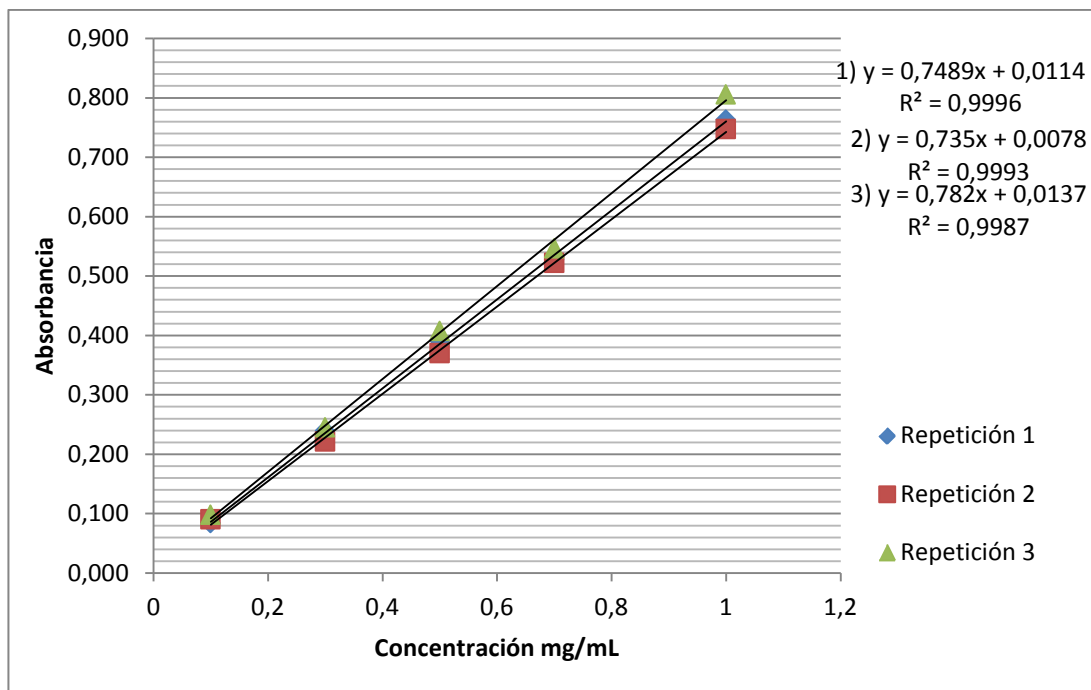
Gráfica 15. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 1,2 a 40,0°C

Tabla 15. Resultados de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para ampicilina en medio Buffer pH 1,2

Temperatura (°C)	Repetición	Intercepto	Pendiente	R ²
25,0	1	7×10^{-5}	0,8056	0,9999
	2	0,0214	0,7970	0,9988
	3	0,0285	0,8347	0,9998
30,0	1	0,0009	0,8171	0,9997
	2	0,0229	0,8035	0,9990
	3	0,0295	0,8390	0,9998
35,0	1	0,0023	0,8210	0,9999
	2	0,0194	0,8199	0,9992
	3	0,0299	0,8534	0,9998
40,0	1	0,0063	0,8390	0,9999
	2	0,0175	0,8390	0,9991
	3	0,0297	0,8704	0,9997

Tabla 16. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada
Medio Buffer pH 7,4 a 25,0°C

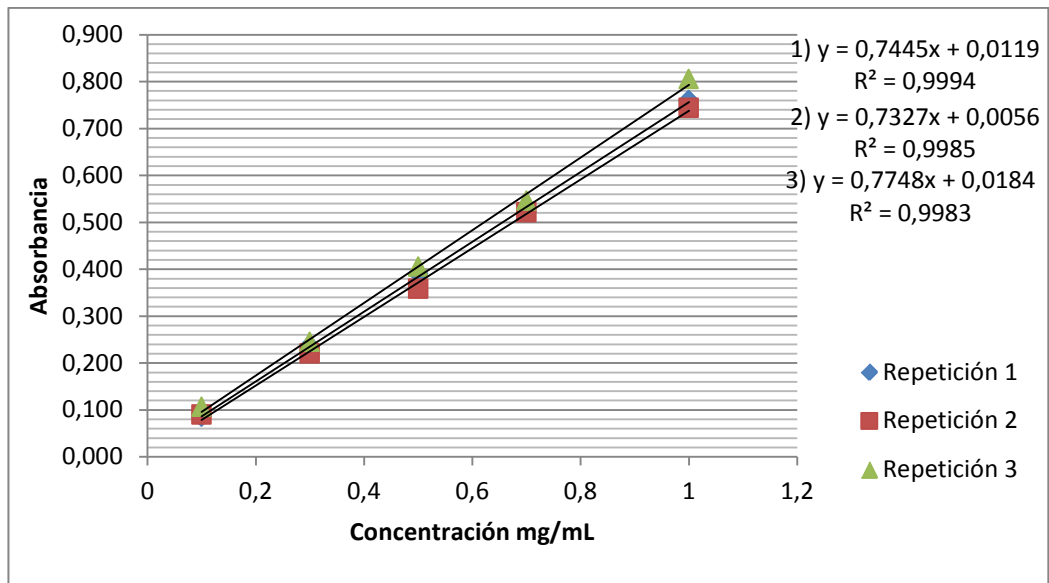
25.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,084	0,084	0,084	0,084	0,0000000	0,00
0,3	0,239	0,239	0,239	0,239	0,0000000	0,00
0,5	0,391	0,391	0,391	0,391	0,0000000	0,00
0,7	0,528	0,527	0,527	0,527	0,0005774	0,00
1	0,763	0,763	0,763	0,763	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0.4008		
25.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,090	0,090	0,090	0,090	0,0000000	0,00
0,3	0,221	0,221	0,221	0,221	0,0000000	0,00
0,5	0,37	0,37	0,37	0,370	0,0000000	0,00
0,7	0,522	0,522	0,522	0,522	0,0000000	0,00
1	0,747	0,747	0,747	0,747	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0.3900		
25.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,098	0,098	0,098	0,098	0,0000000	0,00
0,3	0,245	0,245	0,245	0,245	0,0000000	0,00
0,5	0,408	0,407	0,407	0,407	0,0005774	0,00
0,7	0,546	0,546	0,546	0,546	0,0000000	0,00
1	0,805	0,805	0,806	0,805	0,0005774	0,00
PROMEDIO				0.4202		



Gráfica 16. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 25,0°C

Tabla 17. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada
Medio Buffer pH 7,4 a 30,0°C

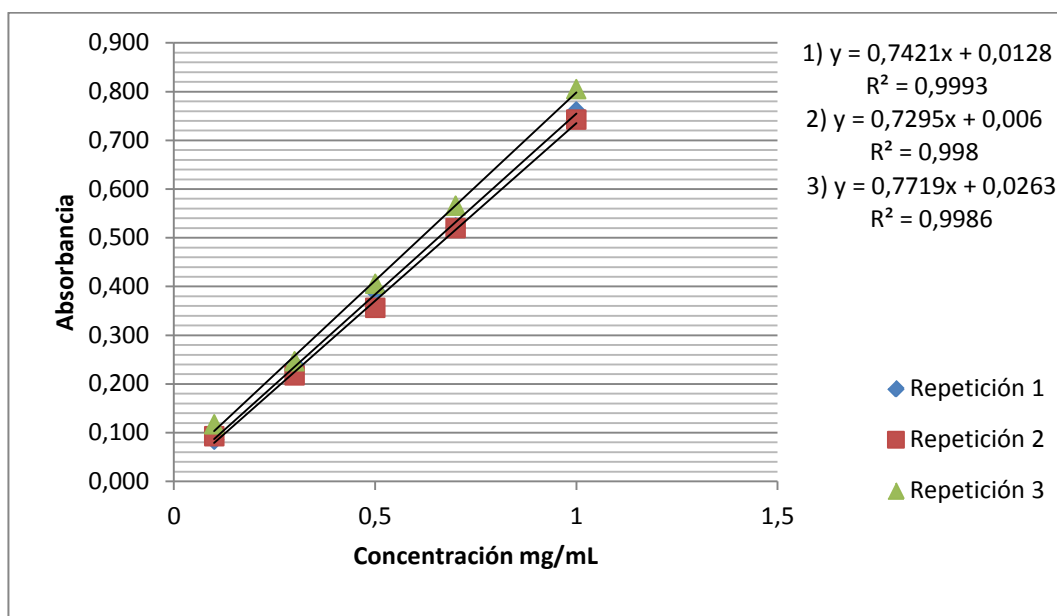
30.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,085	0,085	0,085	0,085	0,0000000	0,00
0,3	0,237	0,237	0,237	0,237	0,0000000	0,00
0,5	0,390	0,39	0,39	0,390	0,0000000	0,00
0,7	0,523	0,523	0,523	0,523	0,0000000	0,00
1	0,760	0,76	0,76	0,760	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0,3990		
30.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,09	0,09	0,09	0,090	0,0000000	0,00
0,3	0,22	0,22	0,22	0,220	0,0000000	0,00
0,5	0,358	0,358	0,358	0,358	0,0000000	0,00
0,7	0,521	0,521	0,521	0,521	0,0000000	0,00
1	0,744	0,744	0,744	0,744	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0,3866		
30.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,106	0,106	0,106	0,106	0,0000000	0,00
0,3	0,245	0,245	0,245	0,245	0,0000000	0,00
0,5	0,405	0,405	0,405	0,405	0,0000000	0,00
0,7	0,546	0,545	0,546	0,546	0,0005774	0,00
1	0,805	0,805	0,805	0,805	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0,4214		



Gráfica 17. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 30,0°C

Tabla 18. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada
Medio Buffer pH 7,4 a 35,0°C

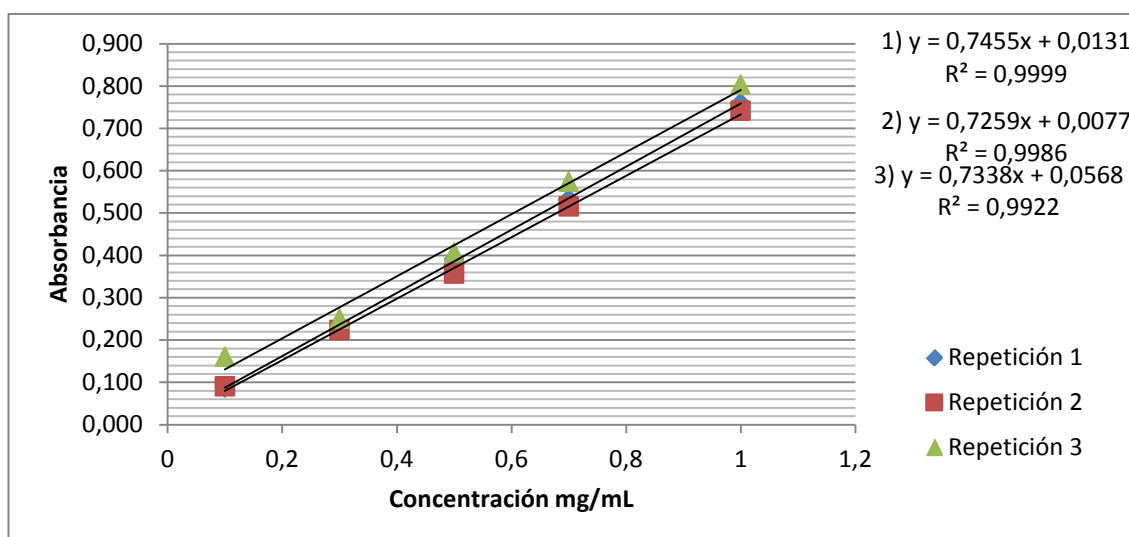
35.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,085	0,085	0,085	0,085	0,0000000	0,00
0,3	0,238	0,238	0,239	0,238	0,0005774	0,00
0,5	0,39	0,39	0,39	0,390	0,0000000	0,00
0,7	0,521	0,521	0,521	0,521	0,0000000	0,00
1	0,759	0,759	0,759	0,759	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0,3986		
35.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,093	0,092	0,092	0,092	0,0005774	0,01
0,3	0,217	0,217	0,217	0,217	0,0000000	0,00
0,5	0,356	0,356	0,356	0,356	0,0000000	0,00
0,7	0,52	0,519	0,519	0,519	0,0005774	0,00
1	0,742	0,742	0,742	0,742	0,0000000	0,00
PROMEDIO				0,3852		
35.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,117	0,117	0,117	0,117	0,0000000	0,00
0,3	0,246	0,246	0,246	0,246	0,0000000	0,00
0,5	0,405	0,405	0,405	0,405	0,0000000	0,00
0,7	0,566	0,566	0,565	0,566	0,0005774	0,00
1	0,802	0,81	0,802	0,805	0,0046188	0,01
PROMEDIO				0,4278		



Gráfica 18. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 35,0°C

Tabla 19. Datos para la obtención de la curva de calibración de ampicilina trihidratada Medio Buffer pH 7,4 a 40,0°C

40.0°C - Repetición 1						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,087	0,087	0,087	0,087	0,0000000	0,00
0,3	0,236	0,236	0,236	0,236	0,0000000	0,00
0,5	0,390	0,39	0,39	0,390	0,0000000	0,00
0,7	0,532	0,532	0,532	0,532	0,0000000	0,00
1	0,759	0,759	0,759	0,759	0,0000000	0,00
40.0°C - Repetición 2						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,091	0,090	0,090	0,090	0,0005774	0,01
0,3	0,223	0,223	0,223	0,223	0,0000000	0,00
0,5	0,357	0,356	0,356	0,356	0,0005774	0,00
0,7	0,515	0,515	0,515	0,515	0,0000000	0,00
1	0,741	0,741	0,741	0,741	0,0000000	0,00
40.0°C - Repetición 3						
Concentración (mg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Promedio	Desviación estándar	CV
0,1	0,160	0,160	0,160	0,160	0,0000000	0,00
0,3	0,250	0,250	0,250	0,250	0,0000000	0,00
0,5	0,406	0,406	0,407	0,406	0,0005774	0,00
0,7	0,573	0,573	0,573	0,573	0,0000000	0,00
1	0,802	0,803	0,803	0,803	0,0005774	0,00



Gráfica 19. Curva de calibración de Ampicilina Trihidratada en media pH 7,4 a 40,0°C

Tabla 20. Resultados de intercepto, pendiente y coeficiente de correlación para ampicilina en medio Buffer pH 7,4

Temperatura (°C)	Repetición	Intercepto	Pendiente	R ²
25,0	1	0,0114	0,7489	0,9996
	2	0,0078	0,7350	0,9993
	3	0,0137	0,7820	0,9987
30,0	1	0,0119	0,7445	0,9994
	2	0,0056	0,7327	0,9985
	3	0,0184	0,7748	0,9983
35,0	1	0,0128	0,7421	0,9993
	2	0,0060	0,7295	0,9980
	3	0,0263	0,7719	0,9986
40,0	1	0,0131	0,7455	0,9999
	2	0,0077	0,7259	0,9986
	3	0,0568	0,7338	0,9922

Prueba t-Student para el Coeficiente de Correlación

Tabla 21. Datos para la prueba t-student para el coeficiente de correlación R

Nº Datos	pH 1,2	pH 7,4	X Δ
1	0,999	0,9996	0,0006
2	0,992	0,9993	0,0073
3	0,999	0,9987	0,0003
4	0,9991	0,9994	0,0003
5	0,9991	0,9985	0,0006
6	0,9992	0,9983	0,0009
7	0,999	0,9993	0,0003
8	0,9991	0,9980	0,0011
9	0,9993	0,9986	0,0007
10	0,9992	0,9999	0,0007
11	0,9992	0,9986	0,0006
12	0,9993	0,9922	0,0071
Media			0,0017
Desviación estándar			0,0026
Grados de libertad (n-1)			11
n			12

Se establece la hipótesis nula y la hipótesis alternativa
 $H_0 = \beta = 0$ No existe correlación lineal entre x e y ($r=0$)
 $H_a = \beta \neq 0$ No debe ser significativamente diferente de uno ($r \neq 0$)

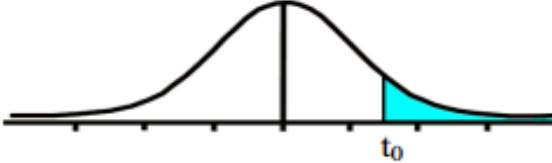
$$X_{\Delta} = \frac{\sum(xA - xB)}{n}$$

$$t_{\text{Cal}} = \frac{X_{\Delta}}{S/\sqrt{n}}$$

Criterio de aceptación: Si el valor obtenido de $t_{\text{calculado}}$ es mayor al t_{critico} . La hipótesis nula se rechaza, existiendo una correlación lineal significativa, por lo tanto $r \approx 1$.

Teniendo en cuenta las ecuaciones para calcular el t_{cal} se obtiene que dicho valor es de 2,265. Para hallar el valor del t_{critc} se tiene en cuenta la tabla de t-Student (ver Imagen 14), por lo que para un $\alpha = 0.05$ y con 11 grados de libertad se tiene un valor de 2,2010. Por tanto, $t_{\text{cal}} > t_{\text{crit}}$ por lo que se rechaza la hipótesis nula H_0 y se puede afirmar que existe correlación lineal significativa entre los datos.

Tabla t-Student



Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788

Imagen 14. Tabla t-Student

ANEXO 2: Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina sódica y Estandarización de las técnicas de saturación de fase

A.2.1 Determinación de la homogeneidad de la temperatura en el baño termostático

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 termostático 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 74RPM, 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).

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.

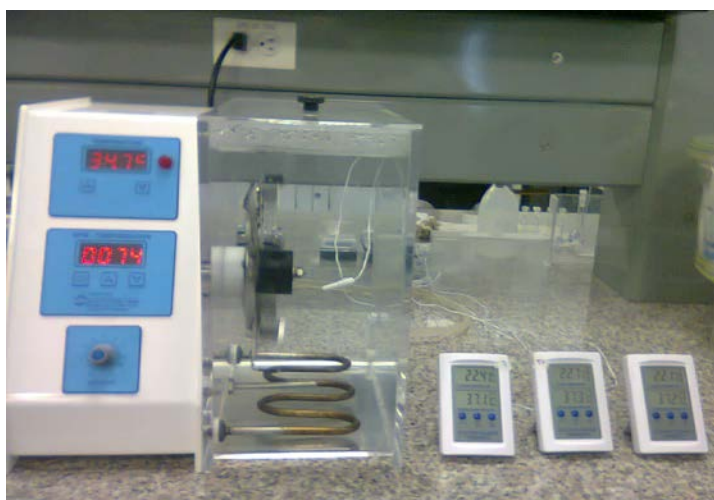
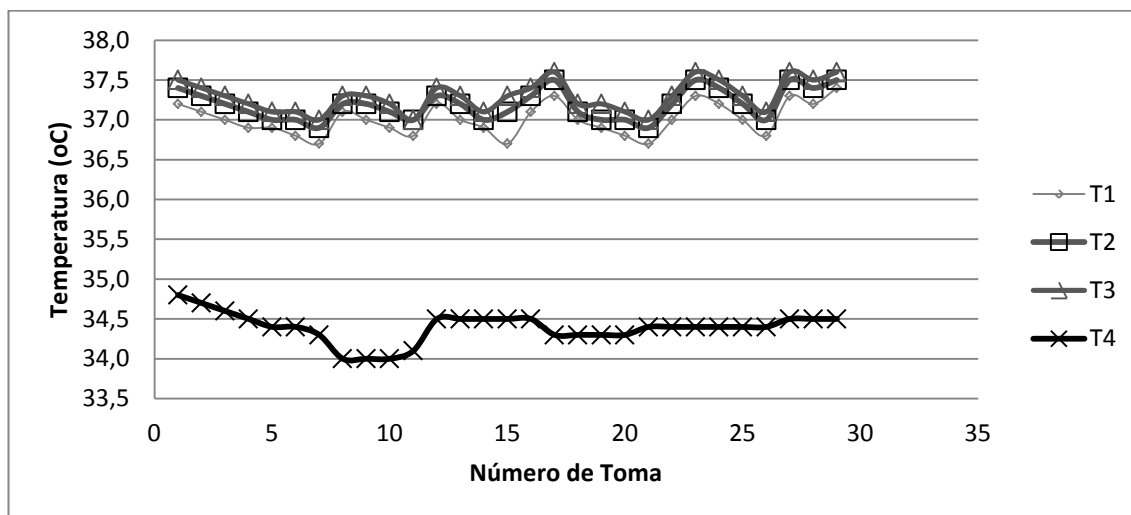


Imagen 15. Ubicación de los termómetros en el baño y registro de las temperaturas de los cuatro termómetros

Tabla 22. Ubicación de los termómetros en el baño

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



Gráfica 20. Temperatura registrada por los termómetros T1, T2, T3 y T4 vs. Número de toma

A.2.2 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 37,0°C, se hicieron girar a 74.0 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 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.

Tabla 23. Medición del volumen de los tubos cerrados con tapa, cada 30 minutos

Tiempo (min)	0	30	60	90
Tubo	Volumen (mL)			
1	10	10	9,9	9,9
2	10	10	9,9	9,8
3	10	10	10	10
4	10	9,8	9,7	9,5
5	10	10	9,8	9,7
6	10	10	10	10

De acuerdo a los resultados anteriores, se observa que cuatro de los seis tubos ensayados no mantienen el volumen inicial, por lo cual nos vemos en la necesidad de establecer un protocolo de cerrado con un refuerzo de parafilm que cubra toda la boca del tubo antes de cerrar con la tapa. Se realizó el mismo ensayo con este nuevo sistema de cerrado y se midió el volumen a 15 minutos. Se toma como volumen inicial el volumen registrado a 90min de la tabla anterior.

Tabla 24. Medición del volumen de los tubos cerrados con refuerzo de parafilm, después de 15 minutos

Tiempo (min)	0	15
Tubo	Volumen (mL)	
1	9,9	9,9
2	9,8	9,8
3	10,0	10,0
4	9,5	9,0
5	9,7	9,7
6	10,0	10,0

A.2.3 Determinación de la concentración de saturación del fármaco

Para la evaluación de los tres métodos de agitación, se tiene que, para la agitación tipo angular 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 termostático, donde es posible depositar hasta seis viales con capacidad para almacenar entre 10- 25 mL de solución (ver imagen 4. 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 imagen 4. 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 imagen 4. C.)

A.2.4 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 ($\mu = 0,15$ M) 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 100RPM.

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 0,15 M). Se ubicaron los tubos en el carrusel del termostato a una temperatura de 37,0°C y se pusieron a girar a 100RPM.

Cada cierto tiempo especificado, se observaba que el sistema llegaba a una fase, se procedía a añadir más antibiótico a cada tubo (tablas 21 y 22). 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 35.0°C.

Tabla 25. Evaluación de la solubilidad de ampicilina sódica en dos medios diferentes (Agua y solución buffer pH 1,2)

Volumen (mL)	Peso (mg)	Concentración (mg/mL)	Fase
4	40	10	1
4	80	20	1
4	120	30	1
4	160	40	1
4	200	50	1
4	240	60	1
4	280	70	1
4	320	80	1
4	360	90	1
4	440	110	1
4	480	120	1
4	520	130	1
4	560	140	1
4	600	150	1
4	640	160	1

El volumen de la tabla anterior representa la cantidad tomada de medio, tanto agua como buffer pH 1,2; y el peso hace referencia a la cantidad tomada de Ampicilina sódica.

Tabla 26. Evaluación de la solubilidad de ampicilina sódica en tres medios diferentes (Agua y soluciones buffer pH 1,2 y 7,4)

Tiempo (min)	Medio (4mL)	Peso (mg)	Concentración (mg/mL)	Fase
0	Agua	601,1	150,3	1
	Solución buffer pH 1,2	601,3	150,3	
	Solución buffer pH 7,4	601,1	150,3	
Tiempo (min)	Medio (4mL)	Peso (mg)	Concentración (mg/mL)	Fase
7	Agua	641,1	160,3	1
	Solución buffer pH 1,2	642,4	160,6	
	Solución buffer pH 7,4	642,2	160,6	
12	Agua	681,5	170,4	1
	Solución buffer pH 1,2	683,2	170,8	
	Solución buffer pH 7,4	683	170,8	
17	Agua	722	180,5	1
	Solución buffer pH 1,2	725,1	181,3	
	Solución buffer pH 7,4	724,9	181,2	

22	Agua	763	190,8	1
	Solución buffer pH 1,2	767,1	191,8	
	Solución buffer pH 7,4	766,2	191,6	
27	Agua	865,9	216,5	1
	Solución buffer pH 1,2	869,4	217,4	
	Solución buffer pH 7,4	868,8	217,2	
Tiempo (min)	Medio (4mL)	Peso (mg)	Concentración (mg/mL)	Fase
37	Agua	969,2	242,3	1
	Solución buffer pH 1,2	969,8	242,5	
	Solución buffer pH 7,4	973,7	243,4	
42	Agua	1069,7	267,4	1
	Solución buffer pH 1,2	1070,6	267,7	
	Solución buffer pH 7,4	1074,2	268,6	
47	Agua	1172	293,0	1
	Solución buffer pH 1,2	1174,7	293,7	
	Solución buffer pH 7,4	1176	294,0	
52	Agua	1274,1	318,5	1
	Solución buffer pH 1,2	1275,7	318,9	
	Solución buffer pH 7,4	1275,8	319,0	
57	Agua	1524,1	381,0	1
	Solución buffer pH 1,2	1528,1	382,0	

	Solución buffer pH 7,4	1525,9	381,5	
62	Agua	1774,4	443,6	1
	Solución buffer pH 1,2	1778,2	444,6	
	Solución buffer pH 7,4	1776,1	444,0	
67	Agua	2027,5	506,9	1
	Solución buffer pH 1,2	2029,5	507,4	
	Solución buffer pH 7,4	2025,1	506,3	

Con el ánimo de obtener la concentración de saturación, como se comentó anteriormente, se evaluaron varias concentraciones de ampicilina sódica en tres diferentes medios (agua, buffer pH 1,2 y buffer pH 7,4), con ello se obtuvo los resultados expuestos en las tablas 21 y 22, los cuales nos muestran que nunca se llegó a observar la formación de una segunda fase en la solución, es decir, que el sistema nunca llegó a saturarse, incluso empleando la concentración máxima de ampicilina en cada medio correspondiente.

Sin embargo, al realizar el ensayo para ampicilina trihidratada, se obtuvieron resultados muy diferentes a los anteriores. En este estudio, se tomaron los valores de absorbancias de los filtrados de cada dilución (tres diluciones por cada concentración evaluada), y se procedió a graficar los datos. Lo que nos llevó a realizar la toma de absorbancias, fue la percepción visual de la formación de dos fases en algunas de las concentraciones durante el ensayo.

A.2.5 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.

Para las otras dos metodologías, se mantuvieron las mismas cantidades de antibiótico y el mismo volumen de medio. En el estudio en shaker, se emplearon viales con tapa plástica (tres por cada concentración), éstos

proveen un sellado hermético, que no permite escapar volumen del medio. La agitación mecánica la realiza una superficie sobre la cual se ubica una gradilla en los que se ubican los viales, a una velocidad de 350rpm, el calor es conducido por el aire, a diferencia del termostato.

En el caso del estudio con plancha de agitación, se emplearon erlenmeyers, cada uno contenía una concentración para evitar la pérdida de medio por el calor, y mantener el equilibrio soluto – solvente, se taparon los erlenmeyers con parafilm, cada erlenmeyer contenía un magneto para su agitación mecánica.

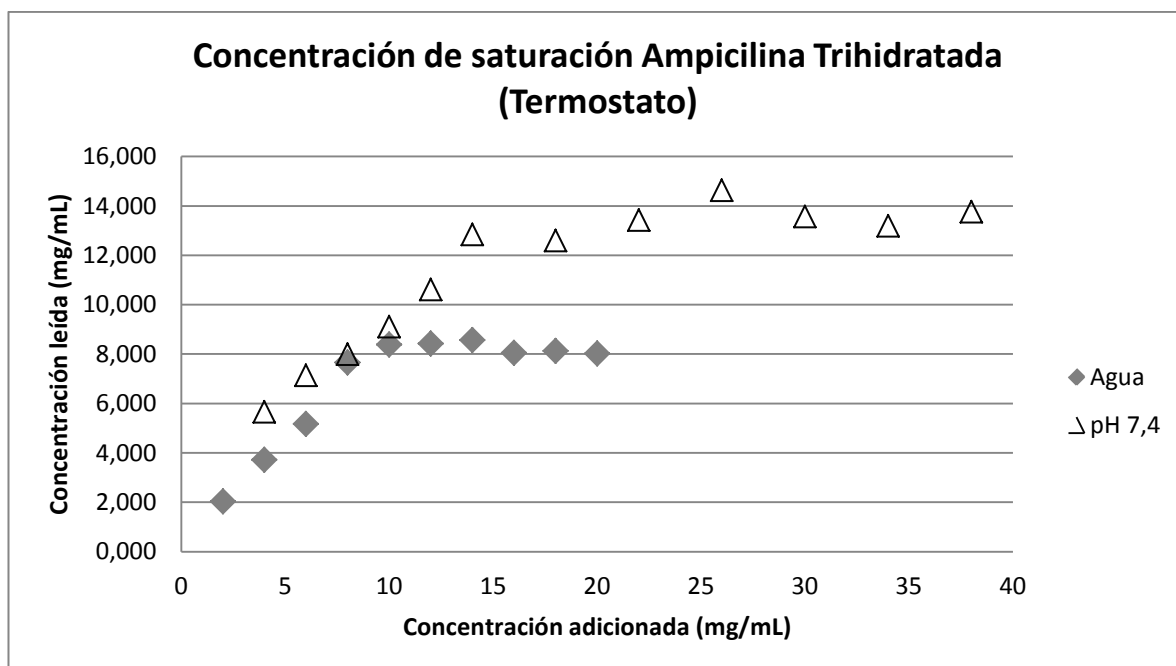
Finalmente, luego de cumplirse los 30 minutos de agitación para los tres métodos, se tomó una muestra de cada uno de los tubos, viales y erlenmeyers y se pasaron a través de un filtro con un tamaño de luz de $0,02\mu\text{m}$; a partir de este filtrado, se tomaron pequeños volúmenes para realizar las respectivas diluciones en balones de 5mL, luego, de ésta dilución se tomaban 3mL aproximadamente para adicionarlos a celdas de cuarzo para leer sus respectivas absorbancias.

A partir de la gráfica obtenida, se puede decir que el sistema se satura a la misma concentración, independientemente del método de agitación que se emplee. La diferencia radica en que se logra una mayor concentración calculada a partir de la absorbancia correspondiente para el ensayo con agitador magnético en plancha de calentamiento y agitación.

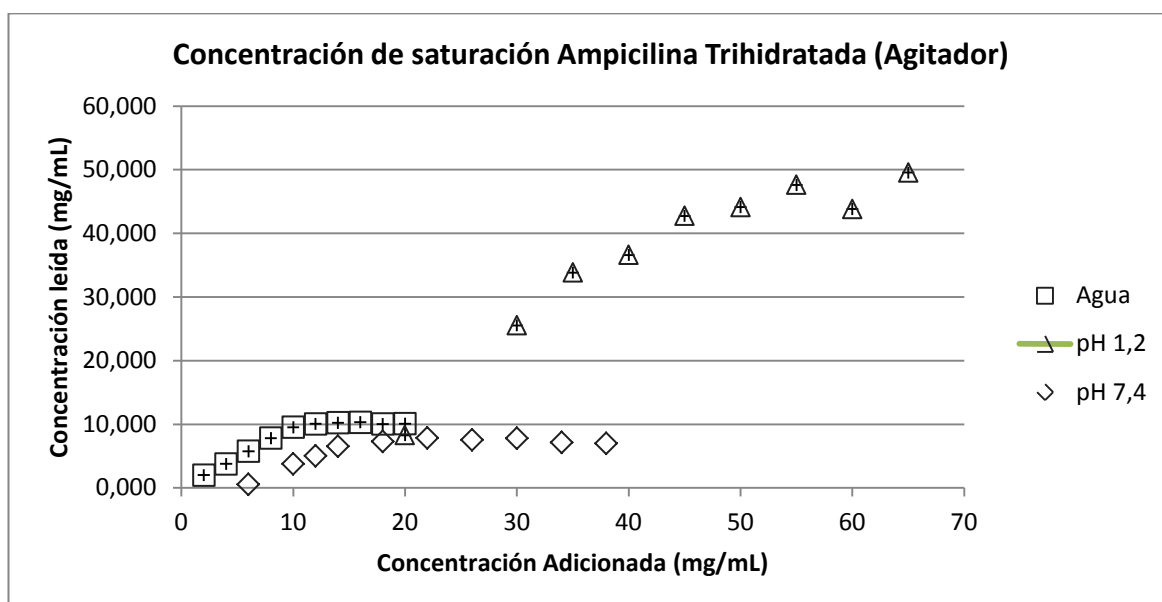
Se empleó el método de agitación en shaker para realizar los perfiles de solubilidad en los tres medios: Agua, buffer pH 1,2 y buffer pH 7,4; a las mismas condiciones del ensayo anterior. Los puntos de saturación del antibiótico en cuestión se determinaron previamente mediante estudios de solubilidad llevados a cabo con el método del termostato.

Se realizaron perfiles de solubilidad tanto en termostato como en shaker, empleando las mismas condiciones de temperatura y velocidad de agitación respectivamente, empleando como soluto Ampicilina Trihidratada, para lo cual se logró obtener las siguientes gráficas de concentración teórica del soluto en cada medio vs. Concentración calculada a partir de las absorbancias obtenidas de cada lectura.

A.2.7 Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en los medios acuosos de estudio

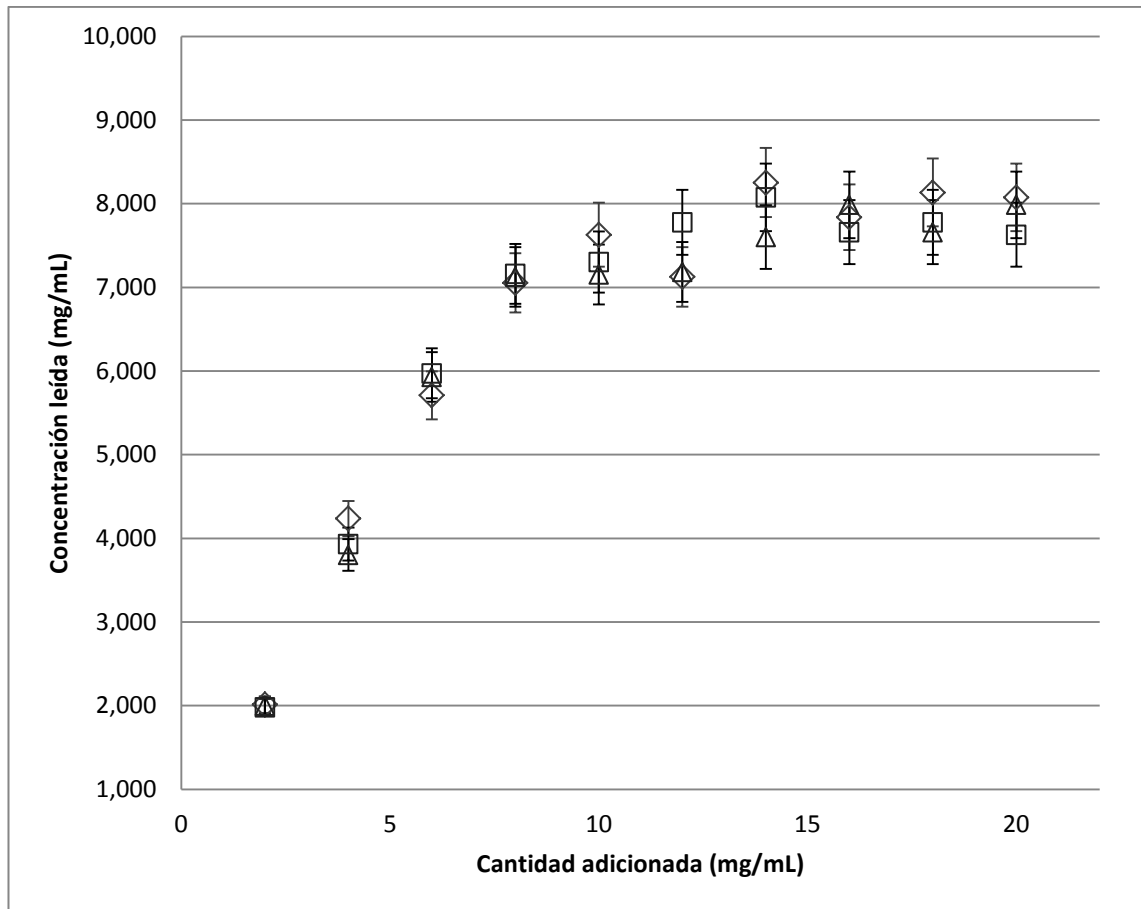


Gráfica 21. Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en tres medios (solución buffer pH 1,2; (solución buffer pH 7,4 y agua) empleando el Termostato como equipo de agitación, a temperatura de 37,0°C

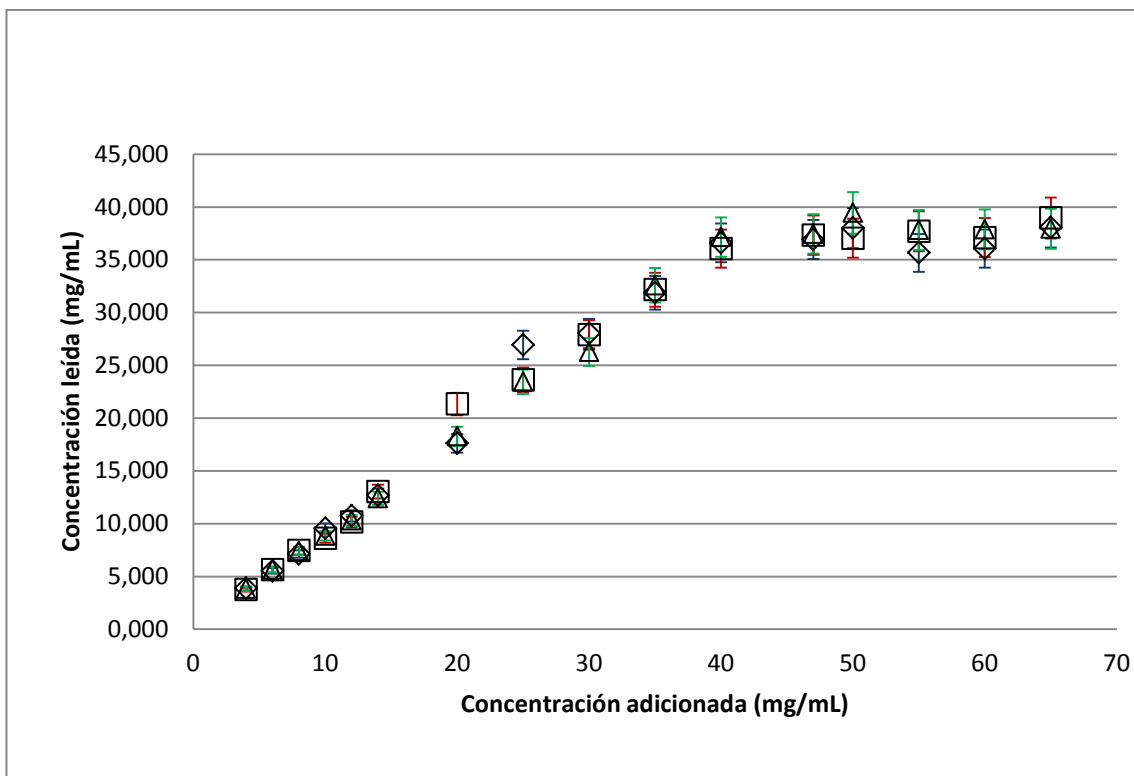


Gráfica 22. Determinación de la concentración de saturación de Ampicilina Trihidratada en tres medios (solución buffer pH 1,2; (solución buffer pH 7,4 y agua) empleando el Agitador magnético a temperatura de 37,0°C

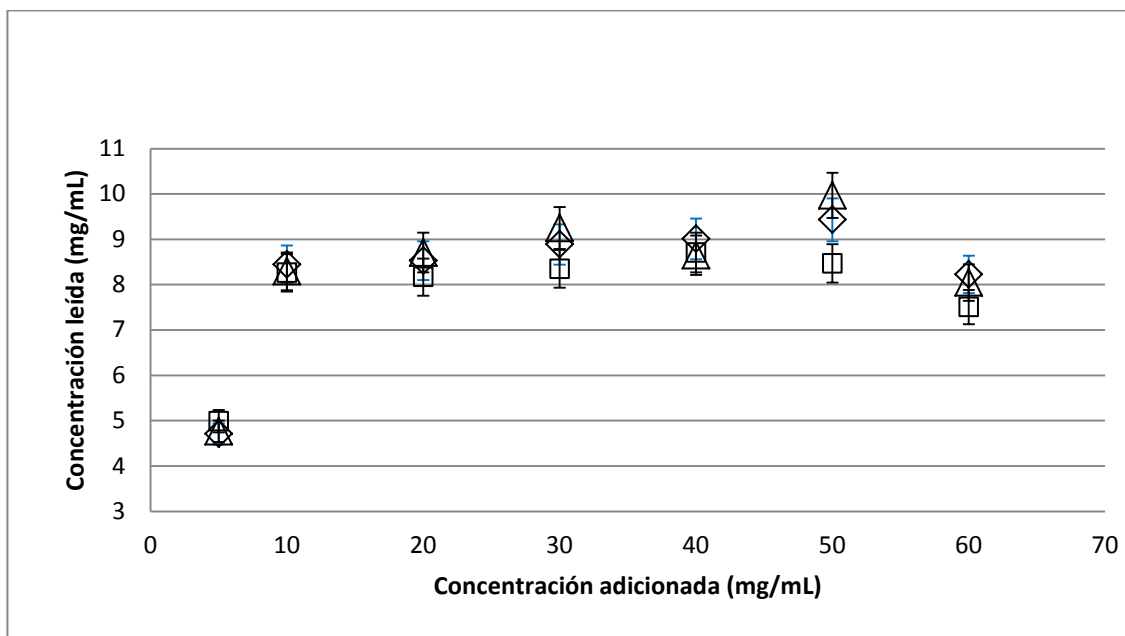
ANEXO 3: Resultados del análisis de varianza



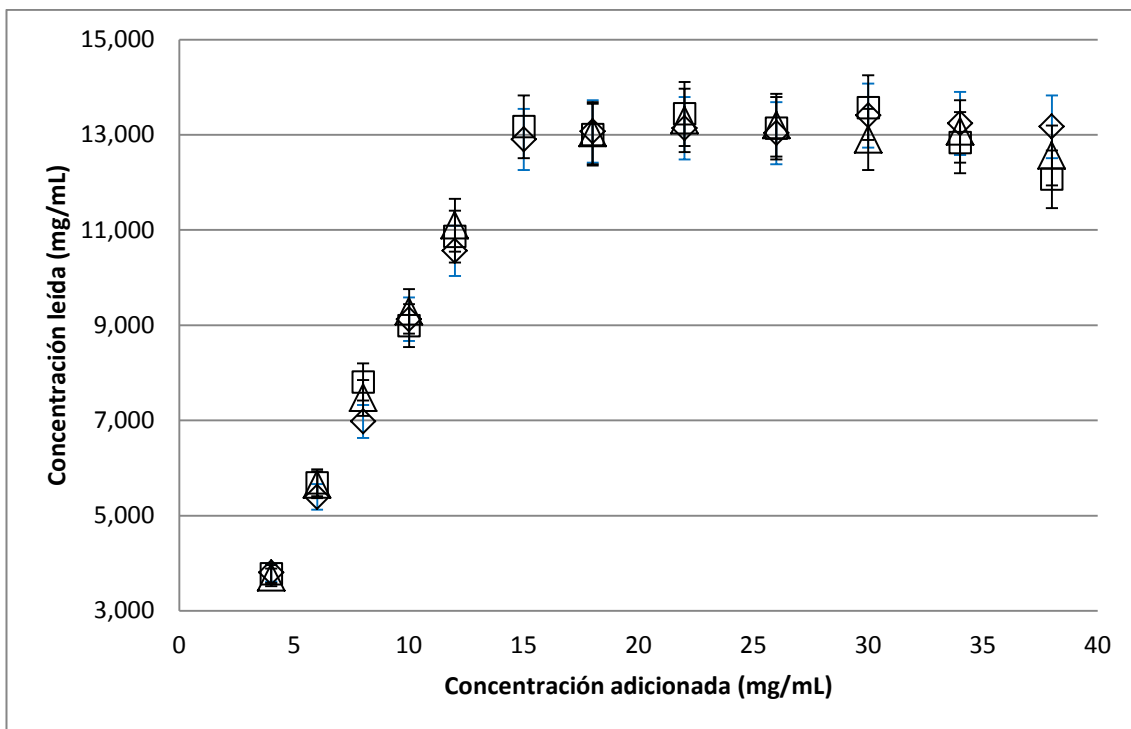
Gráfica 23. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en medio acuoso a una temperatura de 37,0°C. (Δ) Repetición 1, (○) Repetición 2, y (□) Repetición 3



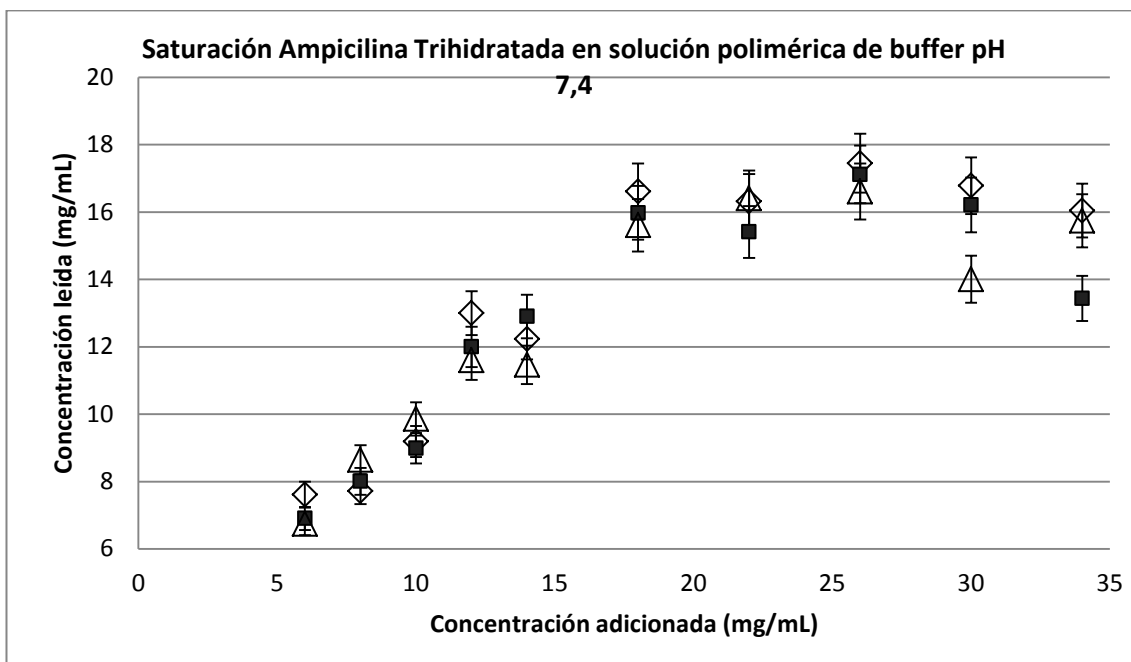
Gráfica 24. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución acuosa de buffer pH 1,2 a una temperatura de 37,0°C. (◇) Repetición 1, (◊) Repetición 2 y (◻) Repetición 3



Gráfica 25. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución polimérica de buffer pH 1,2 a una temperatura de 37,0°C. (◇) Repetición 1, (◊) Repetición 2, y (◻) Repetición 3



Gráfica 26. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución acuosa de buffer pH 7,4 a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◐) Repetición 2, y (◑) Repetición 3



Gráfica 27. Perfil de saturación de ampicilina trihidratada en solución polimérica de buffer pH 7,4 a una temperatura de 37,0°C. (◊) Repetición 1, (◐) Repetición 2, y (◑) Repetición 3

A continuación se muestran los resultados correspondientes al Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo, determinadas a partir del siguiente modelo:

Tabla 27. Valores de solubilidad intrínseca para los medios acuosos

Sistema	Valores de S_0	
	Medio Buffer pH 1,2	Medio Buffer pH 7,4
Polímero	8,44	16,61
	8,26	15,98
	8,29	15,61
Sin polímero	36,61	12,90
	36,07	13,17
	37,15	13,04

Tabla 28. Resultados del análisis de varianza (ANOVA)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	478,1592501	1	478,1592501	3313,38094	$9,2122 \times 10^{-12}$	5,317655063
Columnas	188,2346441	1	188,2346441	1304,36268	$3,785 \times 10^{-10}$	5,317655063
Interacción	735,2527301	1	735,2527301	5094,89753	$1,6528 \times 10^{-12}$	5,317655063
Dentro del grupo	1,154492667	8	0,141311583			
Total	1402,801117	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 acuosos y cuando se encuentran en presencia y ausencia del material polimérico.

ANEXO 4: Preparación de los medios acuosos buffer pH 1,2 y pH 7,4

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.

A.4.1 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 llevando a 1 L. Se realizan los cálculos respectivos para realizar el buffer directamente desde 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 farmacopéicos.

Partiendo de esto, se calcula primero la fuerza iónica de este sistema, para definir cuánto debe ser el exceso de KCl necesario para llegar a la fuerza iónica de 0,15 M.

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

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

Fuerza iónica:

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

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

$$\mu = 0,125 M$$

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

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

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.

A.4.2 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:

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

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.

Se determinan los pesos necesarios de cada reactivo para llegar a 1 L de solución buffer con las concentraciones descritas anteriormente

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

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

Partiendo de esto, se calcula primero la fuerza iónica de este sistema, para definir cuánto debe ser el exceso de KCl necesario 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 necesita entonces un exceso de KCl que aporte 0,074 M de fuerza iónica al sistema. Se realiza el cálculo para expresar este valor en términos del compuesto en su forma sólida.

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

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

ANEXO 5: Certificado de análisis del proveedor para la ampicilina

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

Laboratorio:	Tecnoquímicas	No. de entrada: M122320
Producto:	Ampicilina Trihidrato Polvo	Aprobado (x)
Lote:	F253120	Rechazado ()
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)	

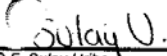
Ensayo	Especificación	Método	Resultado	Fecha
Descripción	Polvo fino blanco cristalino con olor característico	Organoléptico	Cumple	07-Sep-12
Identificación	IR similar al estándar	USP v	Cumple	11-Sep-12
Solubilidad	Ligeramente soluble en agua. Ligeramente soluble en metanol. Prácticamente insoluble o 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	3,5 - 6,0	USP v	4,57	26-Sep-12
Solución 10mg/mL				
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 (dímero): 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 %
ampicillic 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 glycyl 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 Sintesis, 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. Aredzoja M.