

Estudio de procedimientos de obtención de antibióticos betalactámicos solubles mediante el proceso de la liofilización

José R. Ticó Grau

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

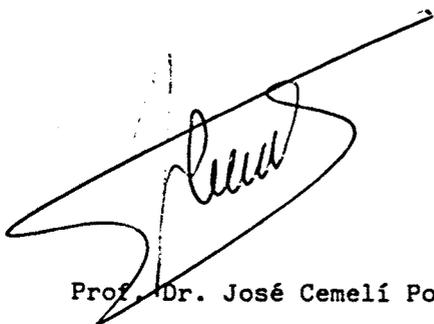
FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO DE PROCEDIMIENTOS DE OBTENCION
DE ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS SOLUBLES
MEDIANTE EL PROCESO DE LA LIOFILIZACION

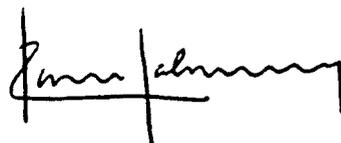
Memoria que para optar al
Grado de Doctor en Farmacia
presenta José R. Ticó Grau

BARCELONA 1987

Trabajo realizado en el Area de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Farmacia de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección de los Profs. Drs. José Cemeli Pons y Ramón Salazar Macián.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'José Cemeli Pons', written in a cursive style with a large, sweeping flourish at the end.

Prof. Dr. José Cemeli Pons

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ramón Salazar Macián', written in a cursive style with a horizontal line across the middle.

Prof. Dr. Ramón Salazar Macián

Mi más sincero agradecimiento
a los Profs. Drs. A. del Pozo Ojeda
y José M^a Suñé Arbussá por haber per-
mitido realizar esta mi tesis doctoral
en su departamento, a los que tan acer-
tadamente la han dirigido y a todos
aquellos que con sus consejos, paciencia
y palabras de ánimo, han ayudado a su
realización.

a Eugenia

als meus pares

al meu germà

als meus amics Santi Alonso i

Khaled Al-Dandachi

I N D I C E

I N D I C E

1. Justificación de la tesis	10
2. Introducción	12
3. Evaluación histórica de la liofilización	15
4. Descripción general del proceso de la liofilización	17
4.1 Aplicaciones	22
5. Técnicas de liofilización	26
5.1 Sistemas acuosos	26
5.2 Sistemas no acuosos	33
5.3 Sistemas acuoso-orgánicos	45
5.3.2 Tecnología de su liofilización	47
6. Parámetros a determinar en una solución a liofilizar	58
6.1 Resistividad	61
6.2 Análisis Térmico	62
7. Control de calidad del producto liofilizado	70
7.1 Caracteres organolépticos	70
7.2 Higroscopicidad	71
7.3 Contenido residual de disolvente	71
7.4 Velocidad de redisolución	73
7.5 Riqueza	73
7.6 Control de vacío	73
7.7 Esterilidad	74
7.8 pH	74
7.9 Grado de transparencia o Clarity Test	74
7.10 Ensayo de partículas	75
7.11 Estabilidad a corto y largo plazo	75
8. Procedimiento de obtención de antibióticos betalactámicos so- lubles	76
9. Generalidades de Cinética Química	79
9.1 Inestabilidad química de medicamentos	79
9.2 Predicción de estabilidad	82

9.2.1. Métodos isotérmicos	84
9.2.2. Métodos no isotérmicos	87
9.2.3. Método de la determinación de la fecha de caduci dad de medicamentos mediante corto almacenamiento a temperatura ambiente	88
10. Generalidades del trihidrato de amoxicilina	93
10.1. Introducción	93
10.2. Síntesis	94
10.3. Propiedades físico-químicas	94
10.4. Valoración	112
10.5. Farmacología y farmacocinética	113
10.6. Acción terapéutica	121

PARTE EXPERIMENTAL

11. Material	126
12. Análisis de la materia prima	127
13. Evaluación de métodos cuantitativos de amoxicilina mediante CLAR	131
13.1. Método CLAR utilizado	131
13.1.1. Validación	138
14. Evaluación de métodos cuantitativos de amoxicilina mediante espectrofotometría	152
14.1. Método espectrofotométrico utilizado	154
14.1.1. Validación	155
15. Método determinación de disolventes residuales. Téc nica de HEAD SPACE	158
15.1. Validación con acetato de etilo	160
15.2. Validación con tert-butanol	162
16. Iodometría para determinación de productos de degra dación	168
16.1. Validación	168

17. Determinación del punto eutéctico por ATD	170
17.1. Método.....	170
18. Otras técnicas utilizadas	183
19. Métodos de obtención de amoxicilina sódica.....	184
19.1. Procesos de liofilización	185
19.2. Liofilización en medio acuoso	189
19.3. Liofilización en medio acuoso-orgánico	212
19.3.1. Liofilización en disolución acuoso-orgánica con tert-butanol	212
19.3.2. Liofilización en disolución acuoso-orgánica con acetato de etilo.....	225
19.4. Obtención de amoxicilina sódica por precipitación..	234
20. Estudios de estabilidad de amoxicilina sódica	238
20.1. Obtención de los lotes	238
20.2. Predicción de la estabilidad (t_{90}) según la ecua <u>ci</u> ción de Arrhenius	240
20.2.2. Cálculos estadísticos	259
20.3. Determinación de la fecha de caducidad de medica <u>ca</u> mentos mediante corto almacenamiento a tempera <u>tu</u> ra ambiente	266
21. Caracterización de los lotes de estabilidad por IR ..	285
22. Productos de degradación	301
22.1. Introducción	301
22.2. Síntesis del ácido amoxipenicilofco	310
22.2.1. Caracterización	310
22.3. Síntesis de la 2,5 amoxipiperacindiona.....	317
22.3.1. Caracterización	318
22.4. Identificación de los productos de degradación de amoxicilina sódica por CCF	320
23. Prospección cualitativa de algunas amoxicilinas s <u>o</u> dicas del mercado	326
24. Programa informático	349
25. Conclusiones	356
26. Bibli <u>og</u> raffa	359

1. Justificación de la tesis :

Los antibióticos, hoy día representan más de la mitad de la producción mundial de materias primas farmacéuticas, y dentro de ellos la amoxicilina es uno de los productos de gran utilización en forma de especialidad farmacéutica. Concretamente, la segunda especialidad de mayor venta en España durante el año 1985 y 1986 contiene amoxicilina (1). En el Mercado Farmacéutico Español existen más de cuarenta especialidades que contienen amoxicilina, de las cuales algunas están en forma de amoxicilina sódica (2).

Dada la importancia de la amoxicilina sódica, y de los problemas que presenta su obtención y la preparación en forma inyectable, nuestro trabajo experimental se ha orientado fundamentalmente a encontrar la metodología más idónea para obtener una amoxicilina sódica lo más pura posible, atendiendo al mismo tiempo a realizar un estudio de estabilidad.

Es conocido que durante el proceso de liofilización, estos productos betalactámicos sufren procesos de degradación, por rotura hidrolítica del anillo betalactámico o bien por la formación de polímeros. Se sabe que estos polímeros son la causa principal de las reacciones anafilácticas que producen este grupo de antibióticos.

La trascendencia del problema y la importancia de este principio activo en su comercialización, ha supuesto que se haya elegido el mismo para llevar a cabo este estudio experimental.

Estos estudios se han orientado a:

- Obtención de amoxicilinas sódicas en disolución acuosa , en disolución acuoso-orgánica, y por precipitación.
- Estudiar comparativamente las distintas amoxicilinas sódicas obtenidas, en relación con su estabilidad y formación de polímeros.

2. Introducción :

Desde la segunda mitad del siglo XIX los descubrimientos básicos de Física y Química hicieron posibles avances espectaculares en el estudio del efecto de las bajas temperaturas sobre las estructuras celulares , que llevó al conocimiento de la importancia del agua para las funciones vitales de las células . El agua es causa determinante de la alteración y descomposición de productos químicos y biológicos. Es imprescindible para que se efectúen la mayor parte de las reacciones químicas y enzimáticas permitiendo a su vez , el ataque por microorganismos con la consiguiente alteración en todos los casos del producto original .

Si se quiere asegurar la estabilidad de estos productos es necesario eliminar o inactivar el agua . Hay dos sistemas principales para ello :

- a . Congelando la sustancia con lo cual , el agua es transformada en hielo y aunque continúa la degradación de las sustancias , la velocidad de las reacciones de degradación es sensiblemente menor.
Sin embargo , la congelación no es siempre un método práctico de conservación , porque aunque bueno resulta caro y además para ello se requiere que el producto se mantenga permanentemente congelado .
- b . Deseccando el producto directamente , utilizando procedimientos suaves , tales como :
 - . Evaporación a presión reducida
 - . Atomización
 - . Liofilización

De los tres últimos sistemas mencionados, el que conserva mejor las cualidades del producto es la liofilización (4). La liofilización consiste en eliminar el agua del producto, congelándolo previamente, de forma que al realizar después un vacío muy elevado, pase directamente del estado sólido al de vapor (sublimación) sin que en ningún momento pase por el estado líquido (5,6).

Es por tanto una auténtica desecación por congelación o crio desecación.

El producto desecado obtenido ha quedado en un nuevo estado de agregación al que llamaremos sólido-líquido o simplemente liófilo, debido a la gran avidez (rápida disolución) que tiene por el disolvente.

Los trabajos aportados por diferentes autores (7,8,9) en el campo de la liofilización, ha permitido deducir las siguientes conclusiones:

- La temperatura a la cual es sometido el producto, está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
- La pérdida de productos volátiles es mínima, debido a la baja temperatura en que se opera.
- El producto, permanece congelado durante la desecación lo que hace que se encuentre en condiciones óptimas de estabilidad durante el proceso.
- No se producen espumas ni burbujas mientras dura el proceso.

- La esterilidad, requisito indispensable en la obtención de productos de administración parenteral, se mantiene durante el proceso.
- El producto liofilizado queda homogéneo (10) y ocupa el mismo volumen que la solución de partida, pero su peso es menor, lo que representa una notable economía de peso en transporte.
- El producto liofilizado, posee un contenido muy bajo de humedad, pudiendo llegar a ser del 0,5%
- El producto liofilizado, se presenta como un armazón sólido sumamente poroso, siendo su solu bilidad extremadamente rápida y completa.
- Durante todo el proceso de la sublimación, se efectúa un elevado vacío, que puede mantenerse una vez liofilizado el producto, lo que a su vez permite cerrar las ampollas o viales con gas inerte.

De todas formas no debe considerarse la liofilización como un método perfecto de conservación, pero bajo todos los puntos de vista, es un proceso extraordinario que permite la conservación de las más variadas sustancias biológicas y químicas (11).

3. Evaluación histórica de la liofilización:

Para que la sublimación del hielo tenga lugar, es necesario que la temperatura de la sustancia congelada se mantenga por debajo del punto de fusión y que el ambiente que la rodea no esté saturado de vapor de agua (5).

A veces estas condiciones se producen de un modo natural, sobre todo en los climas fríos y secos, en los que se puede observar la desaparición del hielo y de la nieve sin fusión previa. Este fenómeno ocurre por ejemplo en los Andes, ya que poseen este tipo de clima, el cual era ya aprovechado por los primitivos incas, los cuales desecaban así la patata para obtener por un proceso de riego primero y exponiéndola a la helada de la noche (puna), una harina que se conserva largo tiempo (12).

El proceso es un hecho relativamente moderno. Se empezó a aplicar a escala industrial durante la Segunda Guerra Mundial.

Sin embargo fué a primeros del siglo XIX, 1.813, cuando WOLLASTON da a conocer con el término Cryochem-preserved, un aparato para la sublimación del hielo llamado CRYOPHORUS.

Posteriormente, en 1.906, los científicos franceses BORDAS y D'ARSONVAL, junto al americano SHACKELL en 1909, descubren la aplicación del principio físico de la sublimación, describiendo un sencillo aparato de liofilización de laboratorio.

El gran impulso de la aplicación industrial de la liofilización se debe a los trabajos de E.W. FLOSDORF, que adoptó el término CRYOCHEM PRESERVED de WOLLASTON y S. MUDD. Trabajando en la Escuela de la Universidad de Pennsylvania,

liofilizan los primeros productos para uso clínico en gran escala, principalmente sueros y plasma humano.

Con motivo de la Segunda Guerra Mundial, los bancos de sangre americanos, empiezan a producir industrialmente plasma humano liofilizado para el ejército. En esta época FLEMING, FLOREY y CHAIN, descubren y sintetizan la penicilina.

El gran éxito de la desecación del plasma y su buena conservación por liofilización, fué rápidamente aplicado a la penicilina y a continuación a muy diversos antibióticos, enzimas, sueros, vacunas, etc., con el fin de prolongar su actividad terapéutica.

Con la aplicación de la liofilización al campo alimenticio, las grandes instalaciones necesarias van siendo perfeccionadas en todos sus componentes, llegándose a obtener procesos totalmente automatizados a fin de conseguir el máximo rendimiento y calidad de producto a bajo coste (13, 14, 15).

4. Descripción general del proceso de la liofilización:

Definición. Estudio teórico:

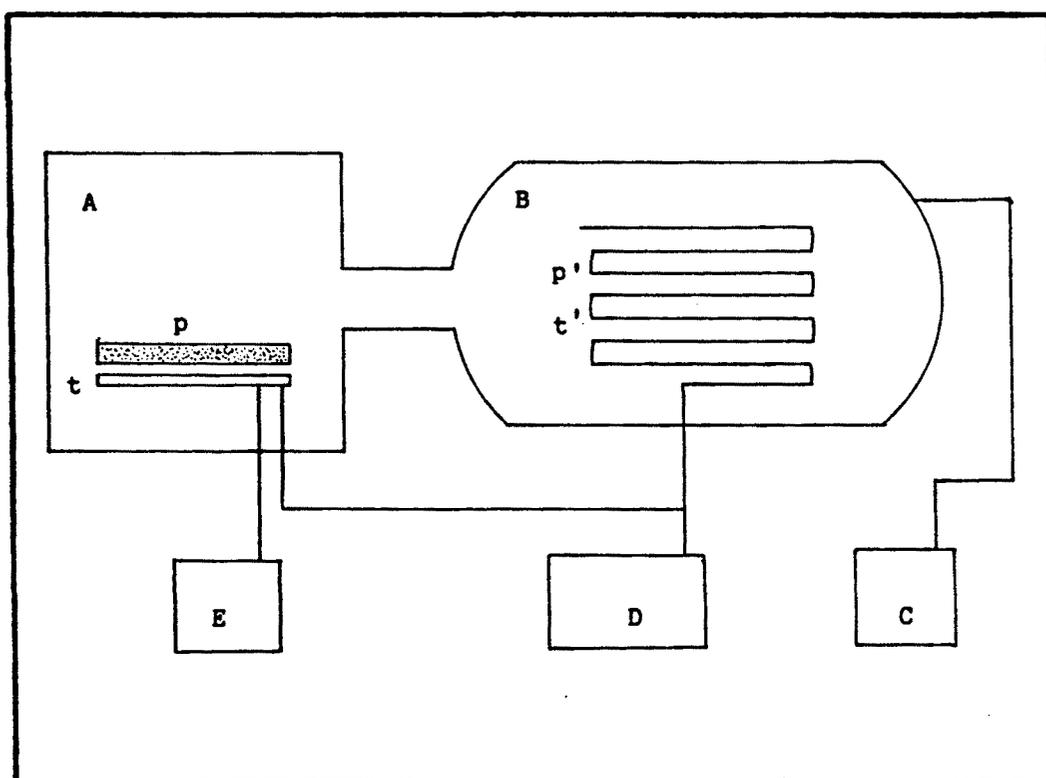
Por liofilización se entiende la desecación efectuada a baja temperatura, de un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío.

El término liofilización, se refiere a una de las propiedades más específicas de los productos secados por esta técnica. La gran avidez por el agua o por los disolventes, que posee el producto seco (Lyo: disolvente. Philo: amigos).

Podemos representar un aparato de liofilización en el esquema de la figura nº 1. Los principios básicos que regulan la liofilización, reposan sobre el diagrama del estado físico del agua punto triple del agua (ver gráfica nº 1).

La variación de la presión de vapor del hielo y del agua líquida en función de la temperatura viene indicada en la gráfica nº 1. El producto "P" congelado previamente, es colocado en la cámara de desecación "A", la cual se mantiene a una temperatura "t" inferior a la del punto de congelación del producto. Se efectúa el vacío en la cámara, de tal manera que la presión " p_0 " medida en la cámara sea inferior a la presión "p" del vapor saturante del hielo a la temperatura "t". A partir de este momento, se producirá la sublimación lenta del hielo, con emisión continuada de vapor. El producto "P" se irá desecando progresivamente.

Para evitar que el vapor de agua contamine el grupo productor del vacío, se intercala un condensador "B", mantenido a una temperatura "t'" inferior a "t". Si llamamos "p'" a la presión obtenida en el condensador, el vapor se condensará en la



- A - Cámara
- B - Condensador
- C - Grupo de vacío
- D - Compresor frigorífico
- E - Grupo calentador

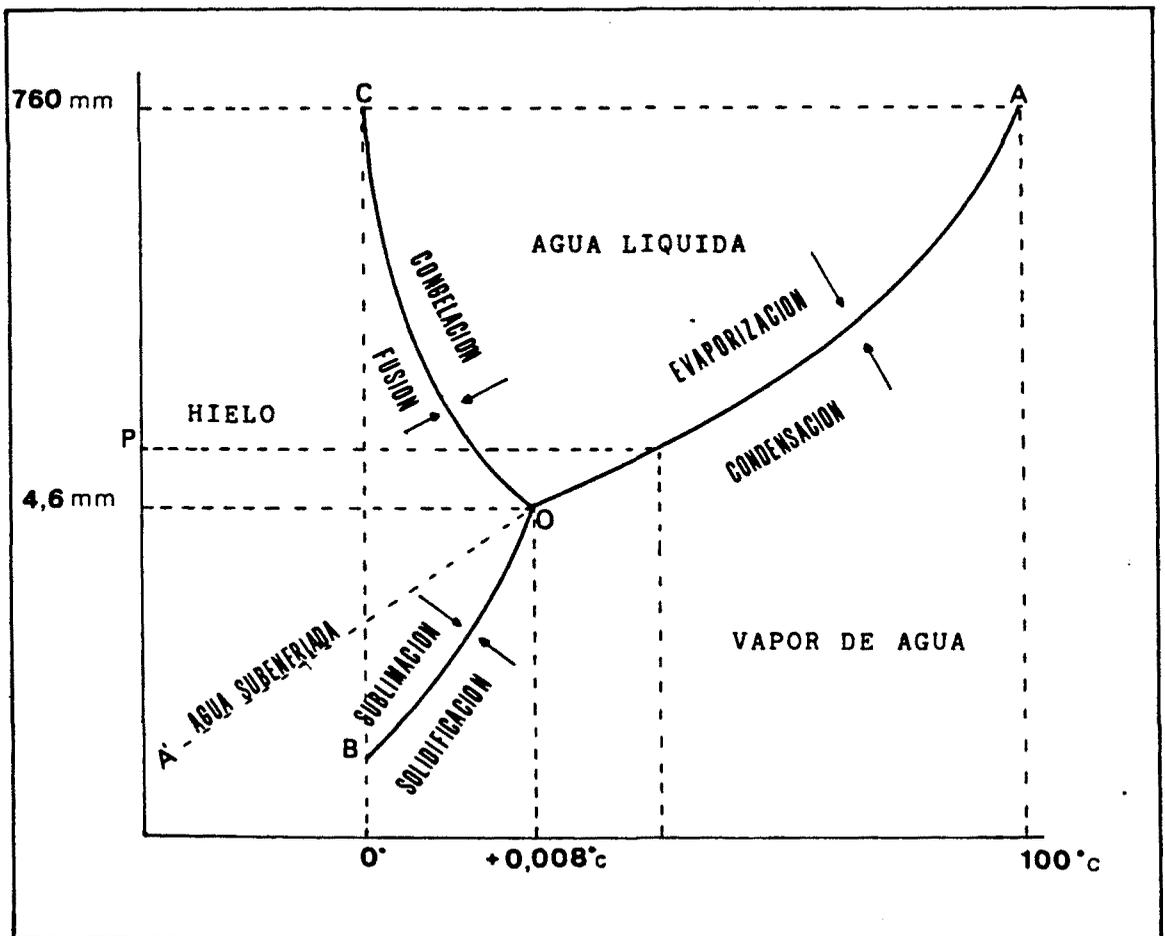
Figura n^o 1 : Esquema de un liofilizador.

pared del condensador, si la temperatura de este "t'" es tal que, la presión de vapor de agua saturante del hielo a la temperatura "t'" es inferior a la presión "p'". Tendremos por lo tanto, la relación de presiones: $p' < p_0 < p$.

El régimen de flujo de vapor emitido por el producto congelado, que se dirige hacia el condensador a fin de ser condensado en su pared, depende de la presión existente en el interior del aparato y por consecuencia de las dos temperaturas "t" y "t'". De ello podemos deducir lo siguiente:

- a. La velocidad de desecación será tanto más rápida cuanto mayor sea la diferencia de presiones "p" y "p'" o lo que es lo mismo, cuando la diferencia de temperaturas del producto "t" y la del condensador "t'" sean mayores.
- b. Si la presión "p₀" en el interior del aparato es relativamente elevada (del orden de los 10^{-2} mm. de Hg), el libre camino medio de las moléculas de vapor de agua emitido es pequeño en comparación con la distancia que separa el producto "P" del condensador "B". El régimen de circulación del vapor será del tipo difusivo. Por el contrario, si el vacío en el aparato es del orden de 10^{-3} mm. de Hg. el libre camino medio de las moléculas es considerable, y el flujo de vapor será del tipo molecular. Conviene en este caso, que la superficie del condensador se encuentre lo más cerca posible del producto y que la conducción entre ambos sea lo mayor posible.

Los cambios térmicos en el conjunto deben estar equilibrados, de tal forma que la cantidad de calorías suministradas en "A" al producto "P", deben ser iguales a las frigorías suministradas en el condensador "B".



Gráfica n° 1 : Punto triple del agua.

Las soluciones, son enfriadas previamente a una temperatura inferior a la de total solidificación del producto. Recordemos que se define punto eutéctico de una solución, a aquella temperatura en la que la solución congela totalmente. Una vez congelado el producto, es sometido bajo vacío y calentado. En ningún momento, debe sobrepasarse en el producto, la temperatura de fusión inicial del mismo, si bien debe procurarse que la temperatura de calefacción sea lo más próxima al punto eutéctico, con el fin de acelerar el proceso.

El período de sublimación, denominado "deseccación primaria", se realiza a una presión inferior a la tensión de vapor del producto. Esta presión será regulada a fin de obtener la máxima transmisión de calor en el conjunto, situándose generalmente en la zona por debajo de las décimas de Torr.

Cuando el hielo ya ha desaparecido completamente del producto y aparentemente ya está seco, se calienta a la temperatura final máxima que acepte la sustancia, sin alcanzar la temperatura de desnaturalización del producto.

Este segundo período de la operación realizada igualmente bajo vacío, se denomina "deseccación secundaria o desorción" y tiene por objeto eliminar el agua ligada al producto y los vapores absorbidos, realizándose a una presión de centésimas de Torr.

Una vez terminada esta fase, se procede al cierre del envase, conservando el vacío en su interior o introduciendo antes de su taponado, aire estéril o gas inerte. En el caso de no disponer de un dispositivo de cierre o de tratarse de ampollas inyectables, el cierre se verifica fuera del liofilizador. (15).

4.1 Aplicaciones de la liofilización:

En principio, la liofilización puede aplicarse a cualquier sustancia que contenga agua, aunque, también es posible liofilizar en medio no acuoso y en medio acuoso-orgánico, p. ej.: metanol, cloroformo, etc.

La aplicación de la técnica de la liofilización es hoy día imprescindible en las Industrias, farmacéutica, química y alimenticia, veterinaria, biología, medicina, etc, dada la gran variedad de productos que han sido sometidos a este proceso de secado.

En líneas generales podemos dividir las aplicaciones de la liofilización en tres grandes capítulos:

- a. Directas: Liofilización de sustancias que requieren esta técnica como único medio de conservación.
- b. Indirectas: Sustancias que la emplean como técnica complementaria.
- c. Especiales

a. Directas:

Siendo el objetivo principal de la liofilización, la estabilización y conservación de productos, hace que su aplicación abarque campos tan diversos como la desecación de:

- Suspensiones bacterianas y víricas
- Levaduras

- Plasma, fracciones plasmáticas y sueros.
- Antibióticos, hormonas, vitaminas, preparaciones enzimáticas, extractos de tejidos, etc.

b. Indirectas:

Son aplicaciones de la liofilización como técnica complementaria en ciertos procesos, tales como:

1. Esterilización de polvos de uso terapéutico
2. Dosificación de productos en polvo muy higroscópicos y difíciles de envasar.
3. Liomicronización

1. La esterilización de un producto en polvo, sensible a los procedimientos normales, se lleva a cabo por disolución del mismo en agua y una vez obtenida la disolución, se filtra estérilmente y se liofiliza.
El producto final será idéntico al de partida pero totalmente estéril.
2. La dosificación exacta de un producto en polvo, resulta a veces muy difícil, cuando la dosis individual es pequeña. En cambio, su dosificación en líquido y posterior liofilización resulta fácil y sencilla.
3. En ciertos medicamentos poco solubles en agua, la liofilización (liomicronización) efectuada bajo condiciones especiales, permite incrementar la superficie específica y facilitar con ello una mayor absorción (16).

c. Especiales:

Como ya indica su propio nombre, la liofilización puede aplicarse a casos muy especiales, tales como:

1. Liofilización de disoluciones no acuosas
2. Liofilización de disoluciones acuoso-orgánicas
3. Microscopía Electrónica
4. Conservación de piezas anatómicas
5. Cirugía humana reparadora y funcional

1. Actualmente se está aplicando la sublimación a la conservación de productos no solubles en agua, partiendo de sistemas no acuosos. Así, pueden ser conservados en estado seco, una serie de productos tales como, vitaminas liposolubles, lípidos, algunos esteroides, polímeros, etc. Los disolventes más empleados en el estudio de las soluciones no acuosas, son el benceno, disolvente orgánico de interés en Biología y Química, y buen disolvente de los fosfolípidos y del poliestireno.

El tetracloruro de carbono, buen disolvente de grasas. Otros disolventes empleados son el amoníaco, dioxano, dietilamina, cloroformo, etc. Disolventes como el amoníaco anhidro se utilizan para la preparación y conservación de radicales libres, perfectamente estables a temperatura ambiente, previamente liofilizados.

2. Las soluciones acuoso-orgánicas a liofilizar pueden tener concentraciones variables de disolvente orgánico y agua. Los disolventes más utilizados en estos casos son el acetato de etilo, aminas orgánicas y alcoholes.

3. En Microscopía electrónica, la liofilización se aplica para la preparación de muestras destinadas a su observación. La muestra de tejido se liofiliza en un equipo especial, se trata con vapores de tetroxido de osmio para su tinción y en la misma cámara del liofilizador se incluye bajo vacío en un plástico de metacrilato, pasándose al microtomo para su corte.

4. La liofilización viene aplicada actualmente para la conservación de piezas anatómicas, pequeños animales, vegetales (plantas y hongos), etc., los cuales una vez totalmente desecados por sublimación, son incluidos en plástico, siendo de gran utilidad en enseñanza, conservación para museos, artículos decorativos, etc. Si el pretratamiento, la liofilización y su inclusión en plástico, han sido correctamente realizados, el material obtenido presenta el mismo tamaño y color que el producto original, pudiendo ser conservados sin precauciones especiales.

5. Actualmente son conservados liofilizados una serie de tejidos que son utilizados en cirugía humana reparadora y funcional, creándose los bancos de arterias, huesos, piel corneas, etc.

Obviamente, el gran número de aplicaciones ha llevado también a una gran diversificación y especialización de la técnica y de los aparatos, así como a conseguir procesos simplificados y automatizados (17).

5. Técnicas de liofilización:

5.1 Liofilización de sistemas acuosos:

Para llevar a término el proceso de desecación por liofilización a nivel industrial, se utilizan equipos y materiales accesorios así como recipientes, que deben ser adecuados a las necesidades del proceso.

La liofilización de un producto puede realizarse de las siguientes formas:

- a. A granel o en Vrac.
- b. Dosis unitarias.

a. A granel o en Vrac:

Para la liofilización a granel, acostumbra a emplearse bandejas de acero inoxidable de fondo perfectamente plano y laterales altos, a fin de lograr una uniforme distribución del producto, evitando que el centro de la bandeja contenga mayor o menor altura de producto al curvarse el fondo de la misma.

El espesor del líquido dosificado en cada bandeja estará en función o de acuerdo con la capacidad de condensación propia del aparato y con la duración del tiempo de la liofilización.

Una vez terminado el proceso de la liofilización, las bandejas son vaciadas y su contenido mezclado para su homogeneización, tamizado posteriormente para la obtención de un polvo fino y

envasado en recipientes normalmente metálicos, de cierre her_umético.

Estas operaciones deben de realizarse bajo valores de humedad ambiental controlada, no superior al 40 % HR y condiciones de ambiente estéril.

Para facilitar esta operación de vaciado y almacenamiento del producto seco, liofilizado a granel, pueden emplearse unas bandejas de tipo especial formadas por un recuadro o aro de acero inoxidable que sujetan una lámina de plástico.

Este dispositivo se conoce con el nombre de VRAC.

La lámina es propiamente el fondo de la bandeja, permitiendo una recogida rápida y aséptica al cerrar herméticamente cada una de las bolsas. Debe de tenerse en cuenta, que el plástico por su baja conductividad térmica, retrasa el proceso de la liofilización.

b. En dosis unitarias:

La liofilización en dosis unitarias puede llevarse a cabo mediante:

1. Congelación simple
2. Congelación fraccionada

1. Congelación simple :

En la liofilización en dosis unitarias, en uno u otro caso, se emplea la ampolla de fondo plano o el vial.

La elección de uno u otro tipo de envase, debe ser tomada en consideración a diferentes criterios, que pueden tener gran incidencia en la conservación del producto, su utilización y dosificación, así como en el precio de uno u otro.

La estanqueidad se obtiene de forma total en la ampolla, si bien hoy se dispone de tapones de caucho butilo o elástomeros que pueden garantizar un cierre hermético de los viales.

La administración de un producto liofilizado en dosis unitarias, exige generalmente una redisolución previa, con ayuda de un disolvente adecuado, contenido en una ampolla o frasco. Esta disolución es menos cómoda en el caso de que el producto a disolver se encuentre en una ampolla, que en un vial.

Asimismo, la ampolla no permite la posibilidad de toma de dosis fraccionadas, comportando además su fragilidad, pérdidas más elevadas en el proceso de fabricación. Por contra, el coste de materiales de acondicionamiento, está en favor de la ampolla.

El costo del vial con el tapón y la cápsula, es siempre más caro que la ampolla.

Por lo que respecta al equipo de liofilización, puede admitirse que éste puede trabajar en las mismas condiciones, tanto si se trata de ampollas como de viales, si bien, por su diámetro, las ampollas permiten una carga mayor de unidades.

Normalmente la ampolla, debe ser de vidrio tipo Jena, de fondo plano y poco espesor a fin de acelerar la transmisión de aporte calorífico y frigorífico en las fases de sublimación y

congelación. El cuello debe ser lo más ancho posible a fin de no dificultar la salida de vapores durante la desecación, lo que podría retrasar el proceso e incluso, provocar la descongelación del producto congelado.

El fondo de la ampolla debe de tener suficiente resistencia a la rotura y a la presión interior ejercida por los vapores en las primeras fases de sublimación, factor a tener en cuenta en el caso de liofilizar productos que contengan elevada proporción de manitol o cuya concentración en sólidos sea elevada a fin de evitar la rotura del fondo de la ampolla, en la primera fase de la calefacción al encontrar el vapor de agua sublimado, dificultad en atravesar el producto y por lo tanto aumenta considerablemente la presión en el fondo de la misma.

En algunos casos se aconseja emplear ampollas que posean una estría en la parte media, para sujetar "in situ" la masa desecada, evitando así la migración de la misma.

El empleo de viales está más generalizado, debido a su facilidad de llenado y taponado, incluso de forma manual, así como permitir el cierre de los frascos al vacío o en atmósfera de gas inerte, en el interior de la cámara del liofilizador al final del proceso, lo que comporta entre otras, la ventaja de no precisar ambiente seco en la sala estéril al retirar de la cámara, al final del proceso, los frascos herméticamente cerrados.

La capacidad del vial, debe de ser suficiente para permitir una redisolución perfecta del producto añadido el disolvente, permitiendo la agitación, por lo que no se aconseja la capacidad total del frasco.

dad determinada se congela rápidamente. Cuando esta primera capa está bien congelada, se añade la solución B, que congelará en la parte superior, sin mezclarse con la primera.

Se trata en definitiva de una congelación fraccionada de dos o tres soluciones distintas, que una vez congeladas quedarán separadas en forma de estratos separados, por una pequeña zona de contacto (20).

En el supuesto que la zona de contacto fuese suficiente para provocar la interacción entre los estratos se puede disponer de capas intermedias constituidas por un tercer material inerte, como glicocola, manitol, polivinilpirrolidona, etc. (p. ej., al 5%).

En lugar de esta solución intermedia de sustancia inerte, puede interponerse agua bidestilada sola, que al sublimar dejará un espacio vacío, suficiente para evitar el contacto entre una y otra solución. De todas formas esto sólo puede hacerse cuando, por ejemplo, los estratos liofilizados procedentes de A y B, quedan adheridos a las paredes del vial o ampolla, pues si el producto total liofilizado se desmorona fácilmente, el espacio hueco intermedio dejado por el agua bidestilada al sublimar, no servirá de nada puesto que se producirá contacto entre los fragmentos de las capas desmoronadas.

Por este método de liofilización en capas se consigue:

- . Separar estratos las diferentes sustancias activas.
- . Mantener la máxima actividad de los productos activos.
- . Simplificar la técnica analítica, puesto que, una vez liofilizado el medicamento se puede separar cada capa para su análisis por separado.

La dosificación del líquido a liofilizar en los frascos correspondientes, no presenta grandes diferencias en los sistemas normales de llenado, si bien es aconsejable emplear bandejas portaobjetos (frascos) que permitan contener las ampollas o viales durante todo el proceso de lavado, esterilización, llenado, liofilización y cerrado final sin necesidad de cambios de formatos en las bandejas.

La maquinaria de lavado, llenado y cerrado, deberá ir provista de rampas de carga y descarga de las bandejas, las cuales van provistas de un lateral movable, para facilitar la carga y alimentación de las ampollas y viales de forma automática, evitando con ello que el producto ya liofilizado permanezca un excesivo tiempo en contacto con la atmósfera.

Debe indicarse que en los procesos normales de liofilización, se aceptan como buenas humedades del orden del 0,5-1,5 %.

2. Congelación fraccionada o en estratos:

El proceso de liofilización en capas o estratos soluciona gran parte de las incompatibilidades químicas entre medicamentos presentes en una misma solución.

Este proceso consiste en disponer los medicamentos incompatibles en dos o tres capas individualizadas (18, 19). Si se pretende separar un producto A de otro B, se preparan dos soluciones distintas, una que contiene el producto A y otra que contiene el producto B. sólo o mezclado con una sustancia inerte, que actúa como soporte (solución A) y otra solución que contiene el producto B, con o sin la incorporación de soporte (solución B).

La solución A, distribuida en viales o ampollas en la canti-

En cuanto a los inconvenientes, y de un modo especial si se añaden una o dos capas intermedias de producto inerte, se presenta un aumento del residuo seco final del producto liofilizado lo que supone:

- . Necesidad de aumentar el diámetro del envase.
- . Disminución del número de envases por carga del liofilizador.
- . Mayor altura del producto a liofilizar si no se aumenta el diámetro del envase.
- . Mayor incidencia del coste del producto.
- . Mayor coste del envase.
- . Aumento del volumen de disolvente necesario para reconstituir la solución, con el consiguiente aumento del coste del envase del disolvente.

Ejemplos de liofilización en capas o estratos son:

- . Hidratos de cloral en presencia de aminofilina o barbituratos sódicos o bromuros sódicos.
- . 5-Adenosilmetionina (estable a pH=1) con guanosina (estable a pH=8).
- . Codecarboxilasa con varios aminoácidos.
- . Cianocobalamina con ácido ascórbico.
- . Clorhidrato de piridoxina (estable a pH=3) con P. A.B.A. (estable a pH=8).
- . Clorhidrato de clorotetraciclina (estable a pH=3) con metilglucamina (estable a pH=9).
- . Vitaminas C y K en cualquier asociación polivitamínica.
- . Cloranfenicol en presencia de sustancias alcalinas.

5.2 Liofilización con sistemas no acuosos:

Hasta ahora muchos productos no se podían liofilizar de una manera normal, es decir en solución acuosa, ya que sufrían procesos de degradación, algunos requerían ser liofilizados a muy baja temperatura, lo que era prácticamente irrealizable debido a la gran lentitud con que sublima el agua a estas temperaturas. Otros por no ser solubles en agua, como por ejemplo, los lípidos (21, 22, 23, 24).

Mediante la liofilización con sistemas no acuosos se consigue ampliar el campo de esta técnica.

Los disolventes que se emplean, son compuestos puros que poseen unas propiedades físicas y químicas constantes. Aunque todos ellos tengan reacciones químicas distintas, deben poseer, cuando menos, dos cualidades esenciales.

- Ser susceptibles de solidificar por enfriamiento a una temperatura no extremadamente baja.
- En estado sólido, poseer una tensión de vapor suficientemente elevada para permitir su extracción por sublimación en un vacío moderado y a velocidad razonable (25, 26).

5.2.1 Disolventes:

Los disolventes no acuosos se emplean cuando por motivos físicos, químicos, técnicos o terapéuticos descartan totalmente un sistema acuoso (25, 26 27).

Entre los disolventes más utilizados tenemos:

- . Amoníaco líquido
- . Cloroformo
- . Dietilamina
- . Tetracloruro de carbono
- . Benceno
- . Dioxano

a) Propiedades físicas de los disolventes:

1. Temperatura de fusión y características del sólido:

En el cuadro n^o. 1 pueden verse las principales características de cada uno de estos disolventes. Puede observarse que las temperaturas de fusión de los disolventes son relativamente bajas, sobre todo para el cloroformo (-63°C), dietilamina (-50°C) y amoníaco líquido (-78°C), lo que quiere decir que la fuente de frío para congelarlos tendrá que llegar por lo menos a -80 / -90°C.

FORMULAS	Pesos Moleculares	Temperatura de ebullición a 760mmHg	Temperatura de fusión a 760mmHg
AMONIACO NH_3	17.03	-33.35	-77.7
CLOROFORMO CHCl_3	119.39	61.15	-63.0
DIETILAMINA $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$ $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$	73.14	55.2	-50.0
TETRACLORURO CARBONO C Cl_4	153.84	76.75	-22.99
BENCENO C_6H_6	78.11	80.10	5.53
DIOXANO $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$	88.10	101.5	11.7

Cuadro n° 1 : Principales características de los disolventes orgánicos más utilizados en liofilización de medios no acuosos.

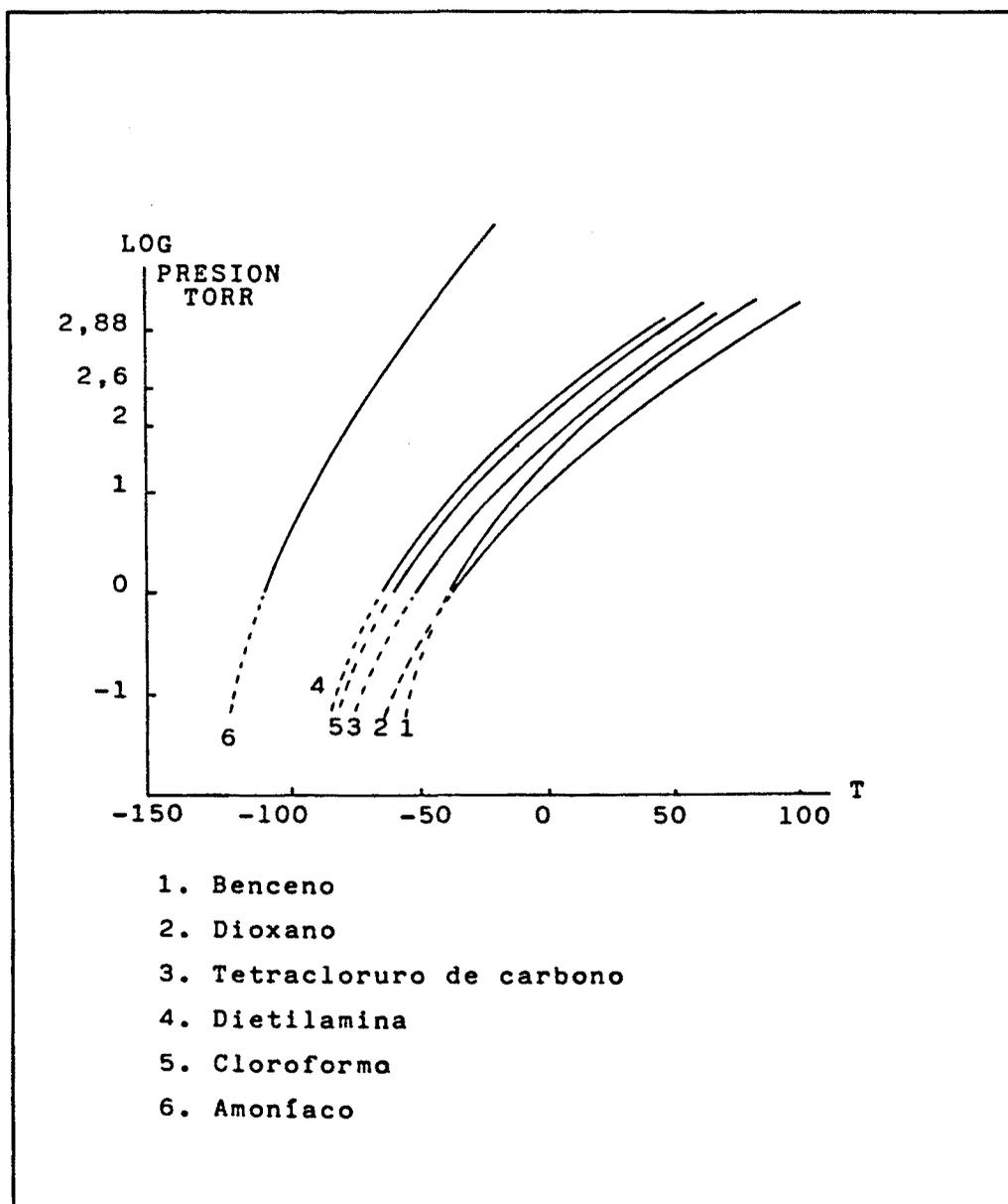
2. Tensión de vapor:

En el cuadro nº 2 y en la gráfica nº 2 puede observarse la relación entre la temperatura y la tensión de vapor de los disolventes, así como las correspondientes curvas de tensión de vapor a diferentes temperaturas.

La extracción de moléculas de gas es posible siempre que la tensión de vapor del disolvente al estado sólido sea suficientemente elevada, ello se consigue si dentro de la cámara del liofilizador se mantienen tensiones de vapor comprendidas entre 0'08 y 4 Torr.

Presión de vapor (Torr)	1	10	40	100	400	760	
BENCENO	-36.7	-11.5	+ 7.6	+26.1	+60.6	+80.1	Temperat. de ebullición
DIOXANO	-35.8	- 1.2	+25.2	+45.1	+81.8	+101.1	
TETRACLORURO CARBONO	-50.0	-19.6	+ 4.3	+23.0	+57.8	+76.7	
DIETILAMINA		-33.0	-11.3	+ 6.0	+38.0	+55.5	
CLOROFORMO	-58.0	-29.7	- 7.1	+10.4	+42.7	+61.3	
AMONIACO	-109.1	-91.9	-79.2	-68.4	-45.4	-33.6	

Cuadro nº 2 : Relación entre la temperatura de ebullición y la tensión de vapor de los disolventes más utilizados en la liofilización de medios no acuosos.



Gráfica nº 2. Tensión de vapor de los disolventes en función de la temperatura.

Si se tienen en cuenta las temperaturas de fusión de los distintos disolventes que figuran en el cuadro n° 1. Las temperaturas probables de liofilización de cada uno de ellos, figuran en el cuadro n° 3.

- Cloroformo: con una temperatura de fusión de -63°C , el producto se deberá mantener a -70°C y el condensador a unos -85 .
- Dioxano: con una temperatura de fusión de $11,7^{\circ}\text{C}$ se podrá liofilizar bien si el producto se mantiene a -20°C y el condensador a -80°C .
- Amoníaco: con una temperatura de fusión de $-77,7^{\circ}\text{C}$ se deberá mantener el producto como máximo a -100°C y el condensador a -120°C .
- Tetracloruro de carbono: con una temperatura de fusión de -20°C , el producto se mantendrá durante la liofilización a -35°C y el condensador a -80°C .
- Benceno: con una temperatura de fusión de $5,53^{\circ}\text{C}$, se podrá liofilizar manteniendo el producto a -20°C y el condensador a -60°C .
- Dietilamina: con una temperatura de fusión de -50°C , el producto se deberá mantener a -55°C y el condensador a -90°C .

Cuadro n º 3

Disolvente	Temperatura probable de liofilización ºC	
Cloroformo	- 85	- 70
Dioxano	- 80	- 20
Amoníaco líquido	-120	-100
Tetracloruro carbono	- 80	- 35
Benceno	- 60	- 20
Diethylamina	- 90	- 55

3. Calor de sublimación:

En general, la energía precisa para lograr una velocidad de sublimación aceptable es menor que en los sistemas acuosos.

Vistas las propiedades de estos disolventes, las principales características de su liofilización son:

- Para lograr una congelación completa se deben al canzar temperaturas de hasta - 90ºC o más, mientras que en medios acuosos suele bastar una con gelación a - 40ºC.
- Su liofilización debe conducirse lentamente, en aparatos especiales (figuras nº 2,3) que obtengan temperaturas en el condensador del orden de - 130ºC.

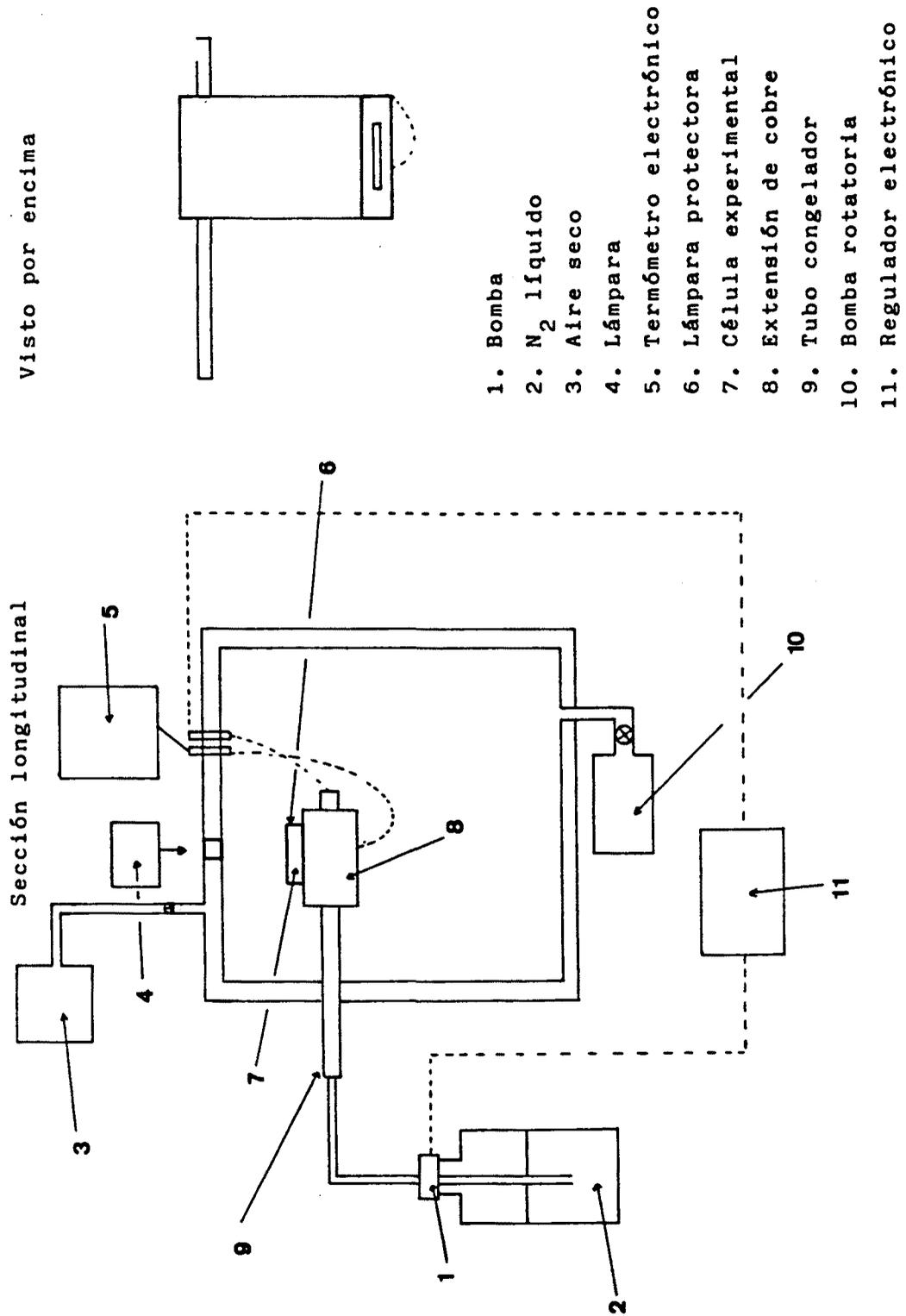


Fig: nº 2. Representación de una unidad de vacío modificado.

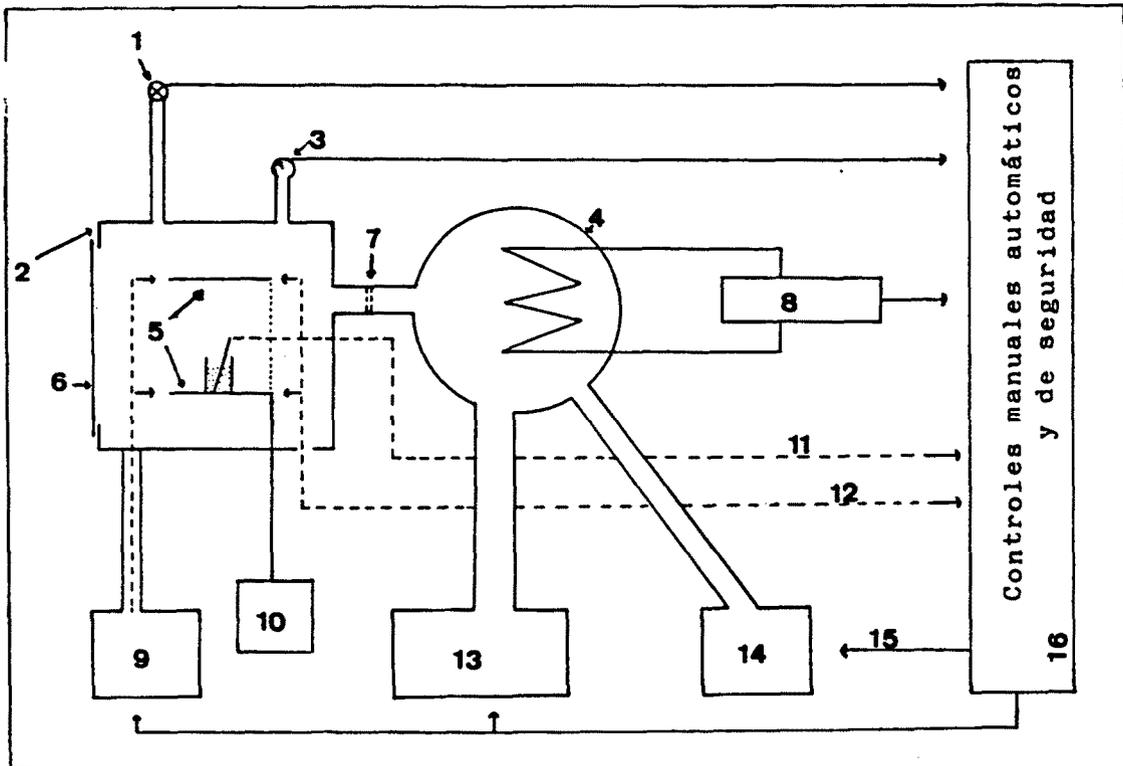


Figura n° 3.

1. Válvula de purga
2. Cámara
3. Presión cámara
4. Condensador
5. Bandejas
6. Ventana de carga de la cámara
7. Válvula
8. Refrigeración del condensador
9. Equipo calefactor
10. Equipo refrigeración bandejas
11. Temperatura de producto
12. Temperatura de bandeja
13. Depósito de disolvente orgánico enfriado
14. Equipo de vacío
15. Vacío en bomba.
16. Sistemas de control
Sistemas de medidores

5.2.1.1 Coadyuvantes utilizados:

Como en el caso de los sistemas acuosos, al liofilizar una sustancia con alguno de estos disolventes puede ser necesario emplear sustancias de carga o de sostén para que el producto liofilizado tenga la consistencia adecuada. Las características que debe poseer una sustancia de carga son: (28)

- . Que su acción no modifique la solución del principio activo.
- . Que sea perfectamente soluble, y que puedan emplearse concentraciones suficientes en el disolvente utilizado, para que la estructura del producto liofilizado sea homogénea y rígida.
- . Que su presencia asegure una buena desecación evitando durante la operación de liofilización que parte del producto sea arrastrada con los vapores del disolvente.
- . Que sus características sean tales que no alteren las propiedades del cuerpo disuelto.
- . Que posea las mismas cualidades de redisolución que el principio activo y que permita una reconstrucción de la sustancia activa conservada, comparable con las condiciones de utilización.

Las sustancias de carga que pueden emplearse para cada disolvente son: (27)

- Benceno: Diesterato de glicol y poliestireno, a una concentración de entre un 1% a un 7,5%.

- Dioxano: Poliestireno, a una concentración del 1% .
- Tetracloruro de carbono: Diesterato de glicol y ácido palmitico, a una concentración del 7,5% .
- Dietilamina: Polistireno, maltosa y monoesterarato de glicerilo al 7,5% .
- Cloroformo: Monoesterarato de glicerilo, polistireno, al 5% .
- Amoníaco: Lisina al 10% .

5.2.2 Aplicaciones de la liofilización en medio no acuoso:

a) Obtención de fosfolípidos:

En 1.965 Dousset (27) liofilizó fosfolípidos de huevo en solución bencénica. Esta sustancia se trataba mediante una solución de metilal-etanol, con lo que precipitaban las proteínas. La solución de fosfolípidos obtenida se evapora a sequedad y el residuo se extraía con cloroformo. Los fosfolípidos se aislaban con acetona y cloruro magnésico.

b) Conservación de radicales libres:

La originalidad de esta aplicación se basa en el hecho de que los radicales libres se encuentran estabilizados por la combinación de dos fenómenos: .

- 1) Los radicales formados por irradiación en el seno de la solución congelada y mantenidos inmóviles por la baja temperatura, se encuentran aislados pero al mismo tiempo inmovilizados en el sitio mismo de formación por el avance del frente de desecación hacia el interior de la masa rígida. Al final de la operación, por ausencia del medio líquido reaccional, no pueden recombinarse y permanecen en el estado de radicales.

- 2) Estos radicales que se forman en el período de activación en las venas del disolvente congelado tienen el peligro de ser arrastrados durante el proceso de sublimación pero son fijados en su sitio por adsorción sobre la enorme superficie interna que representa el frente seco que está ya liofilizado.

Esta superficie actúa como un filtro de los vapores emitidos por la propia muestra comportándose todo ello como un sistema autoadsorbente. Como disolvente se emplea generalmente amoníaco líquido y como sustancia de carga lisina.

Posteriormente los radicales son detectados y cuantificados mediante la Resonancia Paramagnética Electrónica (29, 30).

c) Conservación de efluentes radioactivos:

La liofilización ha sido propuesta también como técnica del tratamiento de efluentes radioactivos. El objetivo es obtener unos lodos nucleares lo más concentrados posible.

d) Obtención de productos pulverulentos y porosos:

La aplicación de la liofilización en medio no acuoso permite la preparación de colorantes en forma pulverulenta y de geles de sílice con notable grado de porosidad (31, 32)

5.3 Liofilización con sistemas acuoso-orgánicos:

Recientemente, un número cada vez mayor de productos parenterales se preparan por liofilización en medio acuoso-orgánico. Las soluciones a liofilizar contienen concentraciones de hasta un 20% de disolvente orgánico, que permite al disminuir la polaridad reducir la velocidad de degradación de ciertos principios activos inestables en agua (Fig. 4). La cantidad de disolvente orgánico residual en el producto liofilizado varía entre un 0,2% a un 12%. La eficacia de un proceso de liofilización y las características de porosidad interna, dureza y porosidad de la superficie de los productos liofilizados de sistemas acuoso-orgánicos depende, del tipo y concentración de disolvente orgánico empleado.

5.3.1 Disolventes:

Los principales disolventes orgánicos miscibles en agua que se emplean en la liofilización de sistemas acuoso-orgánicos son:

- . Metanol.
- . Etanol

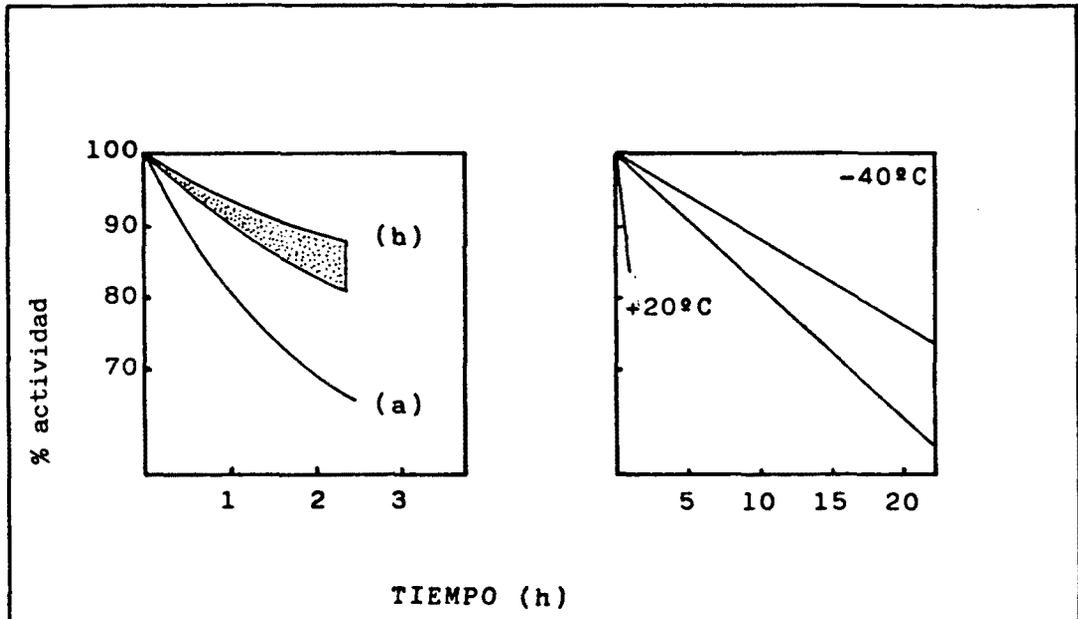
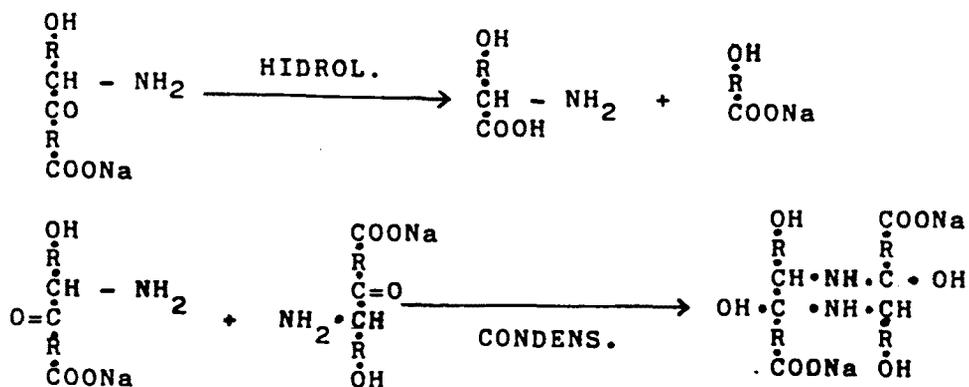


Figura n° 4 .

Ejemplo de un producto inestable que presenta reacciones de hidrólisis y condensación a 20°C. A la izquierda, en agua (a) y en solución acuoso-orgánica (b). A la derecha, en soluciones acuosas con un 10% de etanol a diferentes temperaturas.



- . n-propanol
- . n-butanol
- . tert-butanol
- . Acetato de etilo
- . Acetonitrilo
- . Metiletilcetona
- . Metilisobutilcetona
- . Acetona
- . Diclorometano

Las soluciones a liofilizar contienen entre un 10 y un 25% de principio activo y de un 0 a un 20% de disolvente orgánico. En el caso de soluciones de principios activos inestables en agua debe de controlarse asimismo la temperatura y el pH.

5.3.2 Tecnología de la liofilización de sistemas acuoso-orgánicos:

5.3.2.1 Congelación:

La congelación es distinta si el sistema es acuoso o acuoso-orgánico. En un sistema acuoso, la solución se enfría rápidamente de abajo a arriba precipitando primero pequeños cristales de hielo y a continuación debido a que la temperatura de la superficie desciende por debajo del punto de congelación, ascienden grandes cristales tipo "pluma" hasta la superficie. El tamaño y forma de los cristales depende de la velocidad de congelación y de la concentración de principio activo.

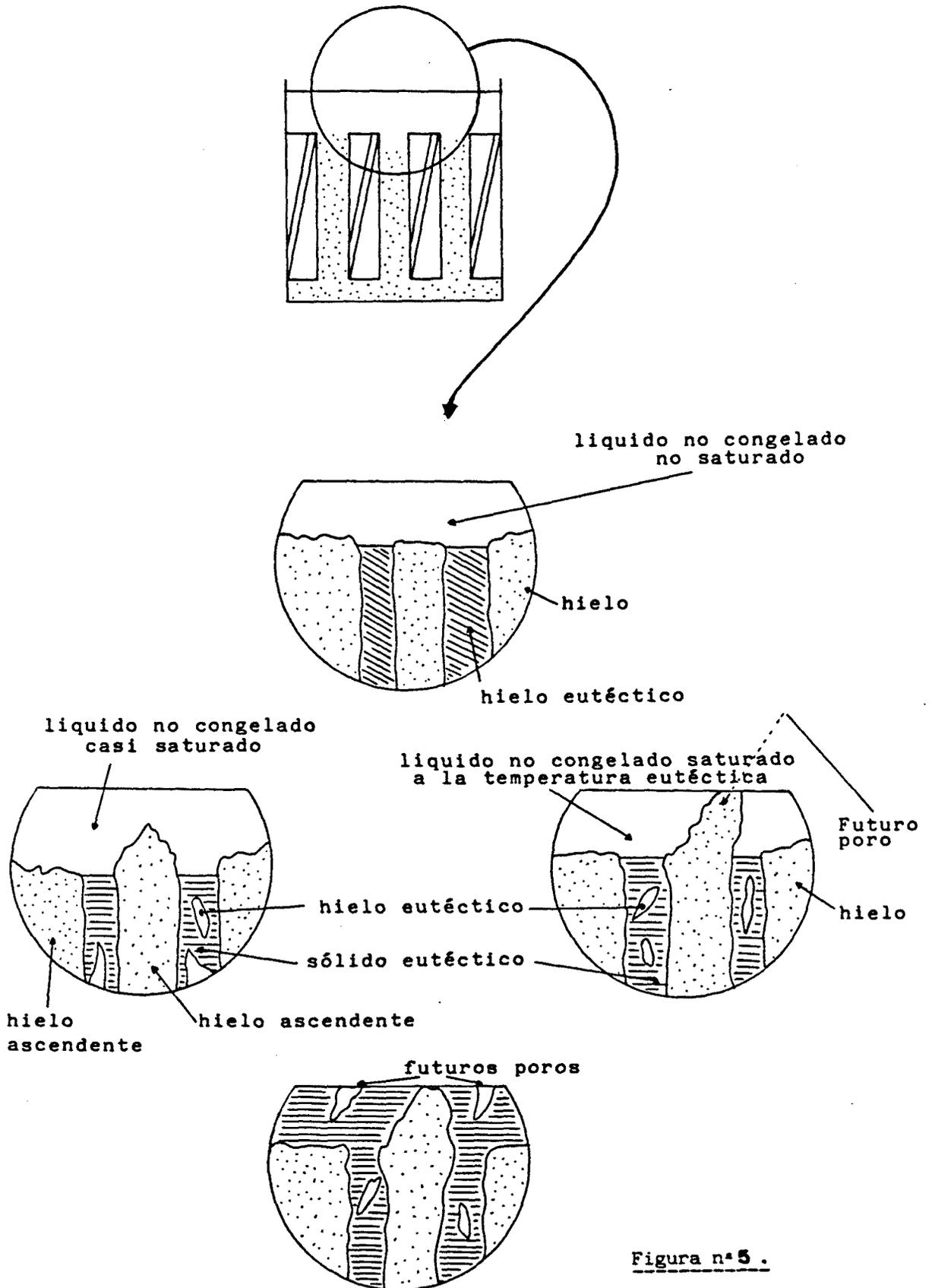


Figura n°5 .

Conforme se separan los cristales de hielo la concentración de la solución aumenta hasta que se alcanza la temperatura eutéctica en la que congela totalmente.

El proceso de congelación se detiene en general entre -40° y -55°C .

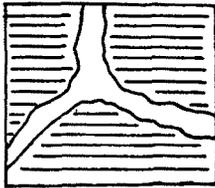
El proceso de congelación es distinto en los sistemas acuoso-orgánicos. Los disolventes con altos puntos de fusión como el tert-butanol, cristalizan con el hielo mientras que los disolventes poco miscibles en agua se separan de la solución en forma de pequeñas gotas. En los sistemas con acetona, estas gotas sedimentan mientras que en los sistemas con acetato de etilo flotan.

En los sistemas con disolventes que no se congelan totalmente como metanol, etanol, n-propanol, n-butanol, acetonitrilo, metiletilcetona, acetato de etilo, diclorometano y metiliso**u**butilcetona, estos permanecen en forma de gotas distribuídas por toda la matriz del hielo. Reteniendo cantidades variables de agua en función de su concentración y de su capacidad de retención de la misma (Figs. 5, 6, 7,).

El volumen de disolvente residual no congelado es mayor en los sistemas con disolventes hidrofílicos (etanol, metanol) que en los sistemas con disolventes menos hidrofílicos (acetato de etilo, n-butanol) mientras que en los sistemas con disolventes hidrofóbicos (diclorometano, metilisobutl**u**lcetona) es difícil de detectar.

En las etapas finales de la congelación, la superficie de sistemas con disolventes volátiles (acetato de etilo, n-propa**n**ol) contiene gotas de disolvente líquido no congelado que se solidifican lentamente por evaporación, formando una superfi-

cie suave, lisa y porosa.



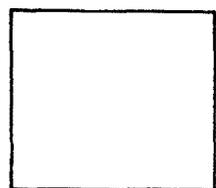
hielo super
congelado



hielo
eutéctico



sólido
euléctico



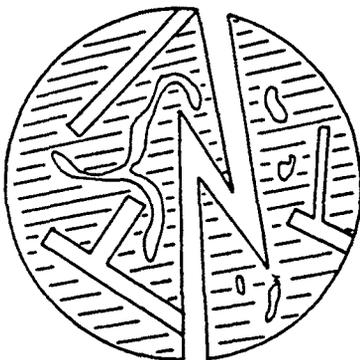
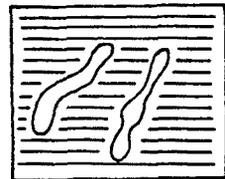
hielo



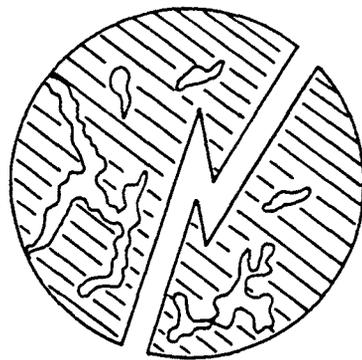
disolvente orgánico

← no
congelado

congelado →



Estructura eutéctica de una
zona sobreenfriada (disol-
vente orgánico congelado).



Estructura eutéctica en una
zona no sobreenfriada de di
solvente orgánico.

Figura n° 6.

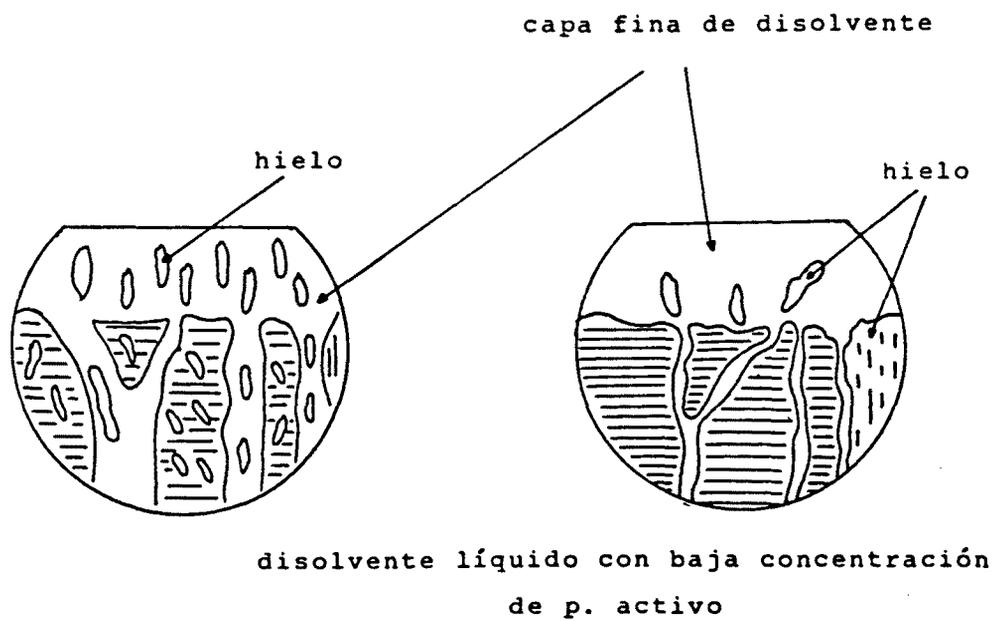
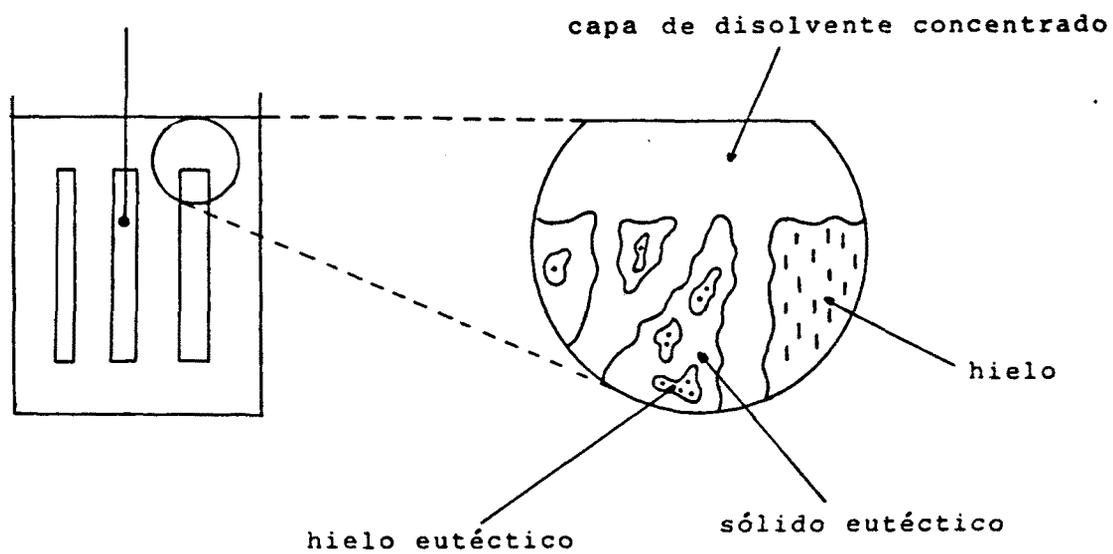


Figura n° 7.

la superficie de las soluciones de sistemas con etanol, metanol y n-propanol, contiene cantidades apreciables de disolvente líquido no congelado que no se solidifica por evaporación . (Cuadro nº 4).

5.3.2.2. Secado.

El mecanismo de secado es distinto según sean:

- Sistemas congelados completamente
- " " incompletamente

En los sistemas acuoso-orgánicos que congelan completamente que contienen p. ej. tert-butanol, el secado se realiza por sublimación directa. El aporte de calor en estos sistemas debe ser superior a la energía requerida para el proceso de sublimación aunque como es lógico sin sobrepasar el eutéctico. El secado es rápido, obteniéndose productos liofilizados secos con un contenido de menos del 1% de agua y del 2% de disolvente orgánico, con superficies lisas y poco porosas.

En los sistemas incompletamente congelados, los productos se secan por sublimación y evaporación simultánea del hielo y del disolvente líquido no congelado. En una primera fase de secado, el disolvente se evapora. Durante este proceso el hielo cristaliza en las capas superficiales, en mayor o menor cantidad en función de las propiedades hidrofílicas del disolvente. Los disolventes no congelados burbujan debido a la vaporización, formando una capa superficial dura, de grosor variable, el cual depende más de la concentración de sólido disuelto que de la altura de capa de disolvente no congelado.

En la siguiente fase de secado, el hielo de las capas superficiales sublima. Las grietas que aparecen incrementan la porosidad y mejoran el proceso de sublimación-evaporación.

El proceso de secado finaliza por desorción simultánea del agua y secado de los residuos de disolvente no congelado debido al vacío.

El aporte de calor debe ser igual o ligeramente inferior a la energía requerida para el proceso de sublimación-evaporación pues de lo contrario el exceso de calor provoca que el disolvente líquido no congelado se expanda y vaporice formando burbujas que ascienden, aumentando la rugosidad de la superficie.

Los sistemas que contienen metanol, etanol y n-propanol se secan lentamente, dependiendo de la velocidad de secado del contenido de disolvente líquido no congelado (cuadro nº 5 y 6). Los productos liofilizados obtenidos quedan húmedos, poseen capas superficiales duras pero porosas y una elevada cantidad de disolvente líquido residual (cuadro nº 4). Estos productos contienen hasta un 1% de agua y entre un 5% y un 10% de disolvente orgánico.

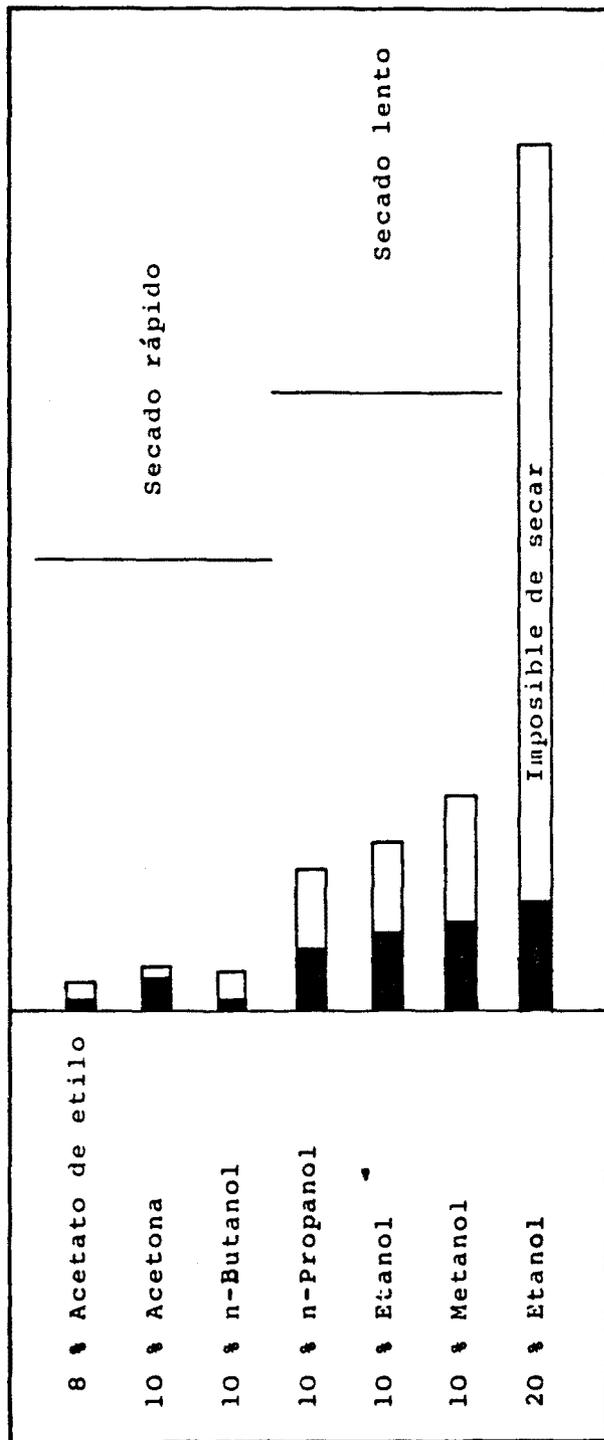
Los sistemas acuoso-orgánicos con disolventes menos hidrofílicos, p. ej. acetato de etilo, acetona, n-butanol, que contienen pequeñas cantidades de disolvente no congelado, se secan rápidamente, dando lugar a productos porosos de capas superficiales lisas poco porosas. Estos productos contienen hasta un 1% de agua y una cantidad de disolvente residual que puede variar entre un 2% y un 12%. Estos disolventes son difíciles de extraer aún después de secados prolongados debido probablemente a la formación de solvatos fenómeno todavía no muy bien conocido.

Los sistemas que contienen niveles bajos de disolventes orgánicos hidrófobos, p. ej., diclorometano y metilisobutilcetona, se comportan igual que los sistemas acuosos, secándose rápidamente y dando productos liofilizados secos con menos del 1% de disolvente orgánico.

En general, los productos con capas superficiales lisas y poco porosas se secan más lentamente que aquellos que tienen superficies rugosas y porosas.

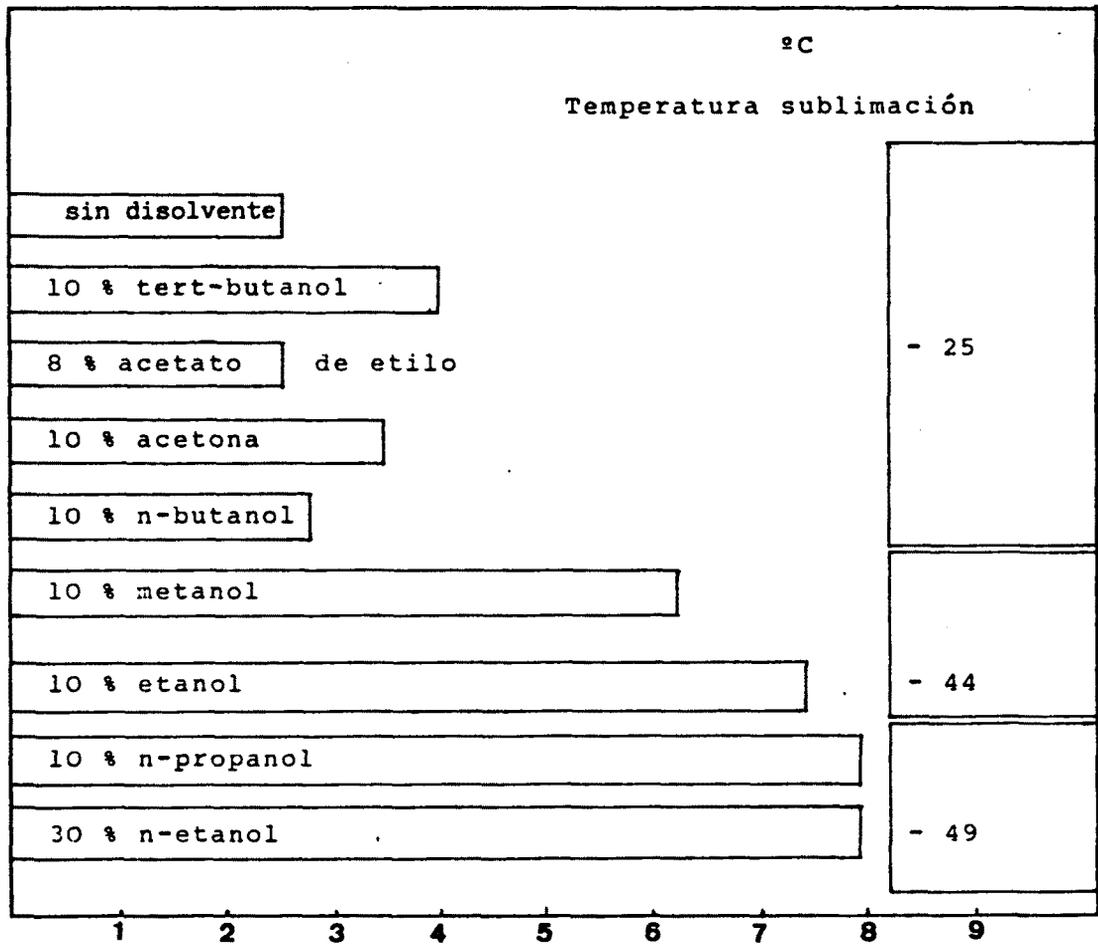
En definitiva la velocidad de secado depende de:

- el contenido de líquido (agua+disolvente orgánico)
- de la masa de producto
- de la presión de vapor del disolvente
- de la viscosidad del líquido residual
- de la superficie de la matriz de hielo
- de las propiedades hidrofílicas del disolvente
- las propiedades de solvatación del principio activo
(33, 34, 35, 36).



Volúmenes comparativos de líquidos no congelados que quedan en la superficie semicongelada de una solución de principio activo en sistemas acuoso-orgánicos. Las zonas en negro muestran el tanto por ciento de sólido disuelto en el líquido no congelado.

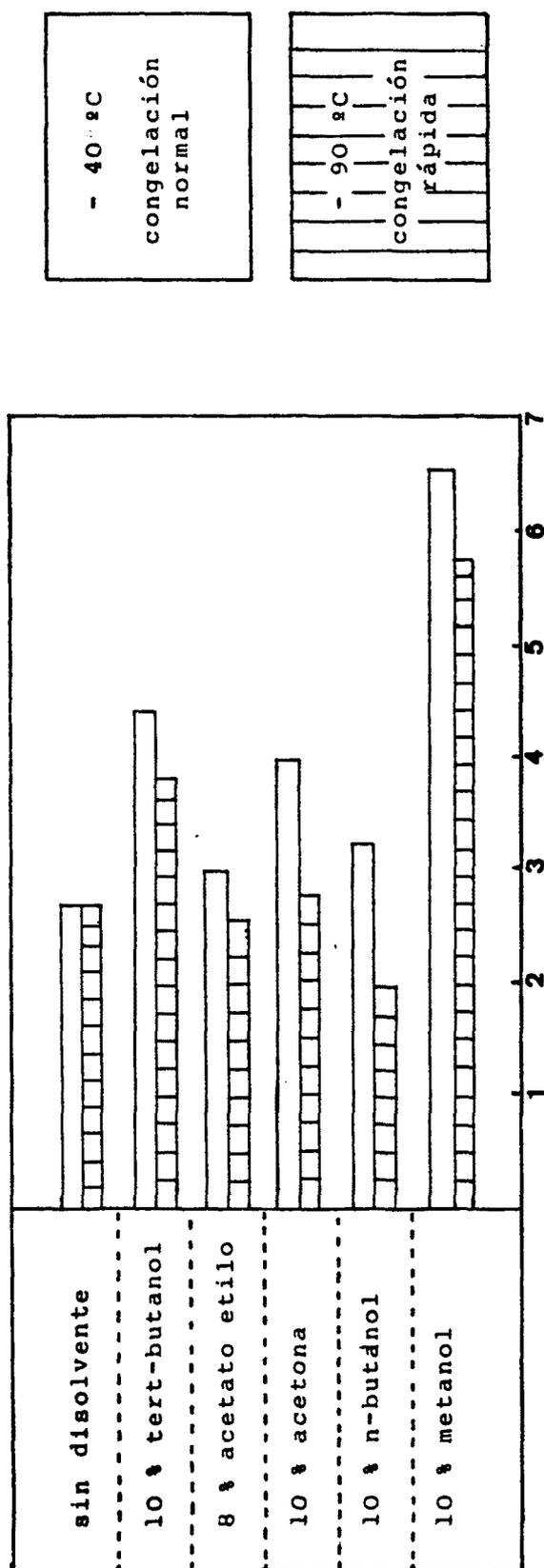
Cuadro n° 4.



Tiempo de sublimación (h)

El n-propanol al 10 % y el etanol al 30 %, son imposibles de secar a esta temperatura, ya que hierven.

Cuadro nº 5.



Tiempo de sublimación (h)

Comparación del tiempo de sublimación, según sea una congelación rápida o normal.

Cuadro n° 6.

6. Parámetros a determinar en una solución a liofilizar:

Los parámetros fundamentales a tener en cuenta en los ensayos gálenicos y de planta piloto de una solución antes del proceso industrial de la liofilización, son: (37)

- . Temperatura de fusión
- . Punto eutéctico
- . Zona eutéctica
- . Temperatura de congelación

Cuando la temperatura de una solución diluída de un sistema binario, como p. ej. cloruro sódico en agua, desciende por debajo de 0°C , empiezan a separarse cristales de hielo casi puros, mientras que en la solución restante aumenta la concentración de cloruro sódico. Este efecto continúa hasta que se obtienen la concentración y punto eutéctico, momento en que se congela completamente una mezcla homogénea de cristales de hielo y cloruro sódico anhidro (38). A esta temperatura se llama punto eutéctico de la solución. La primitiva solución está ahora constituida por un conglomerado de esta mezcla con cristales de hielo que se separaron previamente. Si se hubiera iniciado el proceso partiendo de una solución más concentrada que la eutéctica, serán cristales de cloruro sódico los que se separarán primero.

En otros casos prácticos de liofilización aplicada es difícil encontrar sistemas binarios tan puros como el mencionado anteriormente, puesto que las soluciones biológicas u orgánicas, formadas por distintas sales, poseerán distintos y más de un punto eutéctico, en cuyo caso interesará conocer el eu

téctico más bajo que permita llevar de manera segura el ciclo de liofilización.

En efecto, recordemos que en un proceso normal de liofilización, una vez congelada la sustancia a una temperatura inferior al eutéctico más bajo, y, aplicando vacío al sistema, el hielo irá sublimando hacia el condensador cuya temperatura tiene que ser tal que su tensión de vapor sea menor que la del producto a la temperatura que se encuentre. Cuando más alto sea este gradiente, es decir, la diferencia entre las dos tensiones de vapor, más rápida será la sublimación. Por esta razón se suministra calor al producto durante el proceso, ya que el calor de sublimación que necesita el hielo para sublimar lo toma del mismo producto y llegaría un momento en que su temperatura sería más baja que la del condensador con lo cual se pararía la sublimación.

No siempre, las sustancias a liofilizar presentan uno o varios eutécticos definidos, sino que, por estar muy próximos, la curva que caracteriza las variaciones termodinámicas que se presentan en el producto durante su calentamiento, no presenta máximos definidos, sino una depresión en forma de parábola, que equivale a la fusión continuada de la solución.

Cuando no existen estos puntos eutécticos determinados, el inicio de la parábola depende a veces de la cantidad de calor que la solución recibe por unidad de tiempo. En las soluciones farmacéuticas a liofilizar, muchas veces, en lugar de puntos eutécticos definidos se observan lo que se denominan zonas eutécticas, porque en lugar de encontrar un punto determinado, se obtiene una parábola cuya tangente da, con un margen de dos o tres grados la temperatura a la cual la solución congelada comienza a fundir (39). A esta zona eutéctica que se presenta en muchas soluciones se le denomina temperatura

de fusión de la solución.

Esta temperatura no puede sobrepasarse durante la sublimación sin que se produzca el peligro de ebullición o "puffing".

En realidad, si se pasa de un cierto límite, se podrá provocar una fusión intersticial con lo que el producto se desnaturalizará e incluso puede llegar a destruirse completamente.

La presencia de líquidos intersticiales durante la sublimación provoca:

- . Alteraciones químicas y enzimáticas de la sustancia tratada.
- . Pérdida de agentes aromáticos volátiles debido a la evaporación libre.
- . Pérdida de partículas de polvo seco, arrastradas por el vapor de agua del líquido en ebullición.
- . Formación de espuma en todo o parte de la masa, cuando la fusión intersticial es importante.

Estos parámetros se pueden determinar mediante dos tipos de análisis:

- . Medición de la resistividad del producto.
- . Medición de cambios termodinámicos que se producen en el interior del producto en el transcurso de su congelación-descongelación. (Análisis Térmico).

6.1 Resistividad:

La evolución de la estructura física de un producto acuoso en su paso del estado líquido al sólido es complejo en la mayoría de los casos. La medida de la resistividad se funda en el estudio de las desviaciones de la conductividad eléctrica de un sistema, durante su congelación descongelación, ya que la resistencia de una solución acuosa, cambia y aumenta a medida que la solución se va enfriando.

Aún cuando el producto dé la impresión de estar completamente sólido, continúa subiendo la resistencia al seguir bajando la temperatura. Sólo cuando la solución se halla completamente solidificada, no hay más cambios de resistencia.

Trabajos de investigación realizados por L. Rey han mostrado en la mayoría de los casos que es muy difícil apreciar el estado estructural del producto con sólo la medida de la temperatura, en cambio, la evolución de sus propiedades eléctricas reproduce fielmente las modificaciones estructurales.

Los valores de conductividad o de su inverso, la resistividad, de un sistema, son diferentes cuando se determinan en el curso de la congelación o de la descongelación. Esta medida se lleva a cabo mediante células de resistividad, constituídas por electrodos de forma apropiada, inmersos en el producto e intercalados en el circuito de un galvanómetro sensible (40).

6.2 Análisis Térmico:

Un cuerpo puro se caracteriza por una temperatura de fusión F_0 , definida por el equilibrio sólido-líquido.

En algunas ocasiones, durante el enfriamiento, sucede que el líquido no solidifica a la temperatura F_0 , sino que se obtiene, por un fenómeno de sobrefusión, un líquido "subenfriado" cuyas propiedades están en función del grado de subenfriamiento.

Después de este subenfriamiento, bien por alguna causa externa o bien por la aparición de algún núcleo de cristalización, esta tiene lugar instantánea y totalmente. Pero para los cuerpos de cristalización difícil, la zona de temperatura de este líquido subenfriado se extiende por debajo de F_0 hasta la que corresponde al momento en que el cuerpo toma una nueva forma estructural (42, 41): forma vitrea. Si consideramos el enfriamiento de una solución acuosa, a una temperatura de 10-20°C por debajo de su punto de fusión, en la mayoría de los casos se produce una cristalización completa de la mezcla estudiada (43), pero existen soluciones acuosas de determinadas sustancias que son características por sus sobrefusiones tenaces.

Así el enfriamiento hasta temperatura de -195°C (temperatura de ebullición del nitrógeno líquido) conduce generalmente a estas sustancias (glicerina p. ej.) a un estado vitreo, transparente y rígido.

Los "vidrios" así obtenidos son prácticamente estables y en este sentido no sufren modificación alguna, siempre que se conserven a estas temperaturas bajas. El estado vitreo es

más difícil de alcanzar cuando la composición de la mezcla acuosa se asemeja a las especies químicas de cristalización fácil, en estos casos es necesario someter la solución a un enfriamiento enérgico para obtener esta forma vítrea y aún a veces es difícil de alcanzar. El conseguir este estado depende muchas veces de la velocidad de enfriamiento en relación con la facilidad de cristalización.

Cuando un líquido subenfriado se cristaliza, la facilidad para conseguirlo depende de que existan en el sistema gérmenes cristalinos o gérmenes extraños, cuando sucede uno de estos dos casos y se produce la cristalización, esto se denomina cristalización homogénea. La probabilidad de formación de los gérmenes de cristalización en el caso del agua alcanza un valor muy elevado a -40°C , habiendo empezado a aumentar ya a -20°C . Precisamente estos márgenes (-20°C ; -40°C) son los márgenes entre los que se trabaja normalmente en la congelación de una sustancia a liofilizar.

Por el contrario, esta probabilidad disminuye rápidamente por debajo de -60°C . Como hemos visto que para la formación del estado vítreo es necesario que durante el enfriamiento aparezcan la menor cantidad posible de gérmenes cristalinos, se deduce que para obtenerlo, la velocidad de enfriamiento deberá ser muy grande, de modo que prácticamente no tengan tiempo de aparecer. Aunque cada sustancia es un caso particular, puede generalizarse que para obtener el estado vítreo es necesario siempre enfriar muy rápidamente las soluciones respectivas (44).

Cuando se ha conseguido el estado vítreo de una solución, puede decirse en términos generales que se puede lograr su cristalización, si a partir de aquél, se va calentando pau-

latinamente, produciéndose el fenómeno de la "desvitrificación o cristalización" a partir del estado vitreo. Ello sucede en numerosas soluciones acuosas que tienen gran facilidad al subenfriamiento y a la formación del estado vitreo. Cuando este se va calentando, se producen cristalizaciones más o menos explosivas según los casos, pero en alguno de ellos, al ser la cristalización un fenómeno exotérmico y produciéndose de forma brutal, el aumento de temperatura "in situ" es tan fuerte que se llega rápidamente a la temperatura de fusión de la solución congelada tras un tiempo de existencia del estado cristalino cortísimo.

En otros casos la desvitrificación se produce de una manera más lenta, sin que se produzcan cambios tan bruscos de temperatura. Todo esto hace suponer que la vitrificación presupone la formación de muchos gérmenes cristalinos que, quedando en solución de manera "latente" actúan rápidamente al ser calentado este estado vitreo y producirse la desvitrificación. La transformación vidrio-líquido, no es reversible en el sentido termodinámico de la palabra, pero ello se produce aproximadamente en el mismo intervalo de temperatura, tanto en el enfriamiento como en el calentamiento. Este intervalo de temperatura, cuya extensión puede variar considerablemente con la sustancia estudiada, se llamó "zona de transformación vitrea". La transformación se caracteriza por varios cambios en lo que se refiere a propiedades físicas de la solución, cambios que sirven para detectar estas transformaciones mediante el Análisis Térmico. Cada zona de transformación tiene temperatura específica.

Las dos características más importantes de esta transformación vitrea de una solución, son la disminución de la viscosidad y el aumento del calor específico en el momento de la transformación. Como ej., puede considerarse el aumento del

calor específico en el caso de una solución acuosa de ácido sulfúrico.

Para estudiar la evolución de un sistema congelado, hace falta recurrir a métodos indirectos. En efecto, la observación directa no permite apreciar las modificaciones de estructura que se producen a bajas temperaturas, ya que en la mayoría de los casos, aquellas se desarrollan muy lentamente y a escala molecular, sin que sea posible una apreciación de lo que sucede por sólo los cambios morfológicos.

Por otra parte, las propiedades termodinámicas del producto, pueden sufrir en el transcurso de la congelación o descongelación variaciones acusadas, que pueden ser puestas de manifiesto mediante el Análisis Térmico.

El Análisis Térmico puede ser de dos tipos:

- a) Análisis Térmico Directo
- b) Análisis Térmico Diferencial

a) El principio del Análisis Térmico consiste esencialmente en seguir la evolución de la temperatura en función del tiempo, en el sistema que se estudia, y a través de estos cambios de temperatura interpretar lo que en el interior del mismo está sucediendo: es el llamado Análisis Térmico Directo, que se puede efectuar durante el período de congelación o durante el período de calentamiento de un sistema congelado previamente. Los diversos fenómenos termodinámicos se traducen entonces sobre la curva de temperatura, en forma de accidentes característicos (45).

b) El Análisis Térmico Diferencial (A.T.D.) consiste en estudiar la variación de la temperatura entre el sistema estudiado y una solución de referencia colocada en condiciones idénticas. Constituye un método más sensible y es de interpretación más fácil, razón por la que se ha utilizado en el presente estudio. De ahora en adelante al referirnos al Análisis Térmico Diferencial lo abreviaremos con sus iniciales ATD. El estudio de los cambios termodinámicos de una solución que debemos liofilizar, lo realizaremos siempre durante el transcurso del calentamiento de la solución congelada, ya que por fenómenos de retardo en la cristalización (congelación) es más difícil estudiar estos fenómenos durante el proceso de enfriamiento. Por su parte, la curva de congelación sirve para conocer cual es la temperatura a que deberá enfriarse para obtener una solución perfectamente congelada.

Como líquido de referencia se utiliza agua bidestilada, puesto que si el agua congelada a -196°C se va calentando hasta 0°C , proporcionándole una cantidad de calor constante por unidad de tiempo, su temperatura aumenta linealmente en función del tiempo (41, 42). Por el contrario, si se calienta en las mismas condiciones una solución acuosa salina congelada; su temperatura no se eleva linealmente, debido a que se producen diversos cambios de estado (38), tales como:

- Recristalizaciones (fenómeno exotérmico)
- Fusiones (fenómeno endotérmico)
- Cambios de calor específico

Por lo tanto si se calientan paralelamente desde -196°C

a -0°C una solución salina y agua bidestilada, después de una recristalización en la solución, se observa, que la temperatura de esta última se vuelve temporalmente más elevada que la del agua. En realidad, debe entenderse en el momento mismo de la cristalización y mientras ésta dure. Análogamente, en el momento de la fusión (y mientras ésta dure), la temperatura de la solución se vuelve inferior a la del agua destilada, ya que el calor proporcionado, el agua lo emplea para calentarse, en tanto que la solución lo emplea para ir fundiendo.

Si en la solución problema existe una transformación vítreo, su calor específico aumenta es decir se calienta menos deprisa que el agua y su temperatura se aleja de la de ésta. En el momento en que el calor específico alcanza su nuevo valor, es decir, cuando la transformación vítreo ha terminado, la diferencia de temperatura con el agua permanece constante.

6.2.1 Determinación del Análisis Térmico Diferencial:

En el ATD se investiga, durante la congelación y calentamiento del producto problema, dos datos importantes:

- 1) Temperatura a que se encuentra el problema, en cualquier momento del análisis (T_s).
- 2) Variaciones de temperatura que en cualquier momento se pueden producir en el producto problema, tanto en la congelación como en el calentamiento posterior (T_d).

Estas variaciones, se refieren siempre a la temperatura que presenta el agua bidestilada (T_a), tanto en la congelación como en el calentamiento.

Para la determinación del punto eutéctico por medio del ATD de nuestras soluciones, hemos empleado un equipo cedido gentilmente por el Dr. Solé Peix (19) que consta de (Fig 8):

- Bloque metálico, con cuatro cavidades en las que se coloca la solución problema y de referencia con sus correspondientes termopares.
- Caja isotérmica.
- Registrador XY, especialmente diseñado para la práctica del ATD.

En la gráfica nº 3, se observa el ATD de una solución acuosa de cloruro sódico al 10%, utilizada como patrón para la calibración del aparato.

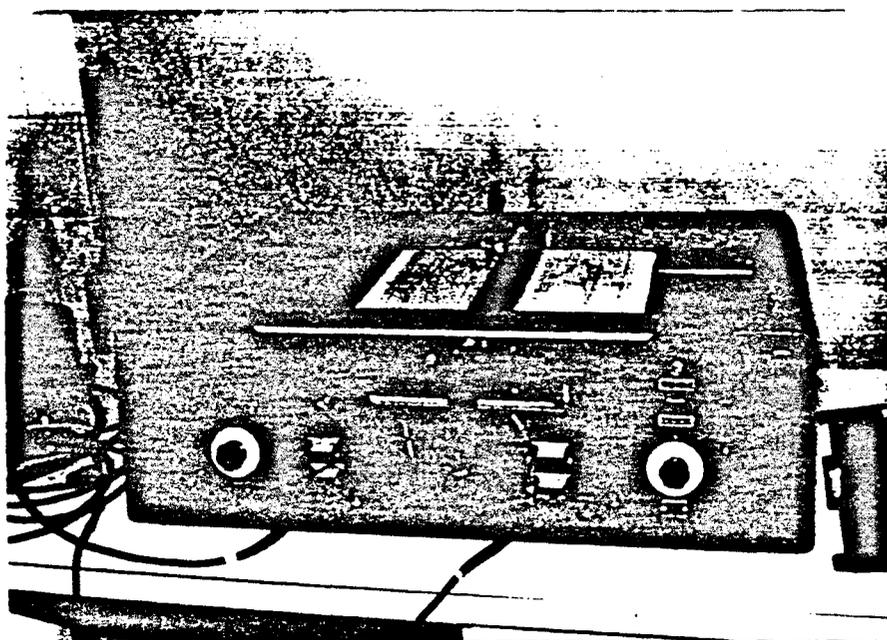
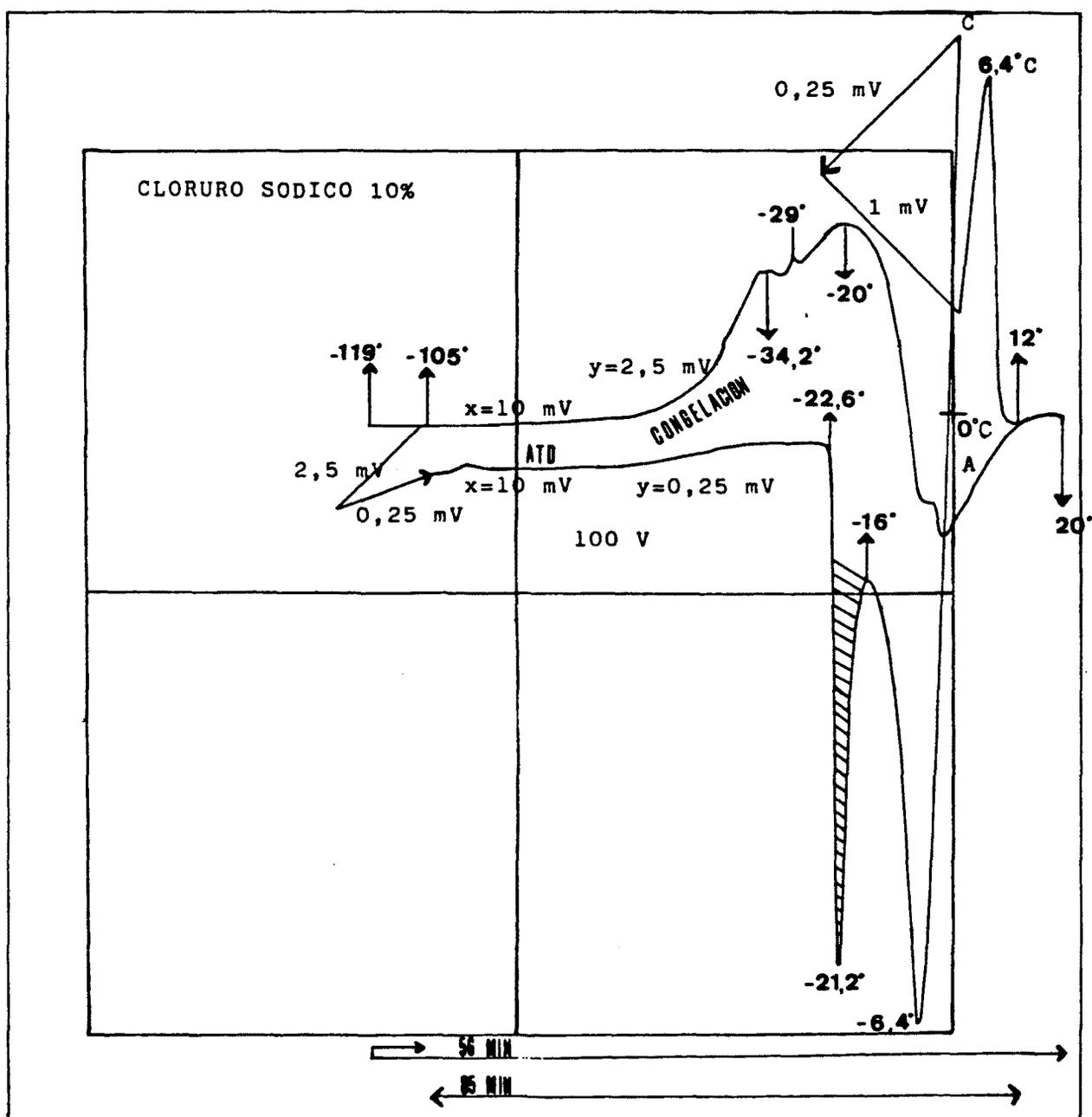


Figura nº 8 : Registrador XY empleado para el ATD.



Gráfica nº 3. Determinación del punto eutéctico de una solución acuosa de cloruro sódico al 10%.

7. Control de calidad del producto liofilizado: (46)

7.1 Caracteres organolépticos:

La calidad organoléptica en cuanto al aspecto del producto viene dada por el grado de identificación que presenta y la que fué diseñado al momento de su planificación e investigación.

Dado este punto de vista, las características a considerar son las siguientes:

- Uniformidad de aspecto en el conjunto del liofilizado sin alguna de zona heterogénea por migración de principios activos coloreados.
- Ausencia de restos de disolvente , consecuencia de una desecación insuficiente y que puede dar lugar a la formación de cráteres en la superficie del liofilizado.
- Volumen idéntico al de la solución de partida. Una reducción del mismo se debe a:
 - Desecación insuficiente.
 - Rehidratación parcial a la salida del congelador.
 - Insuficiencia de cargas.

Y suele ir acompañado de trazas o anillos brillantes. En cambio un aumento de volumen es debido a una acción combinada de la fusión (más o menos importante) y de la presión

reducida, dando lugar al "puffing", pudiendo llegar a formar espuma.

7.2 Grado de higroscopicidad:

Define la capacidad de absorción de agua por parte del liofilizado. Su medida permite evaluar el tiempo máximo admisible después de la salida del liofilizador hasta el cierre de los recipientes. Para medir este tiempo, se dejan los recipientes abiertos al aire libre, en las condiciones higrométricas de final de trabajo y se estudia la curva de pesos en función del tiempo. Una vez determinado este tiempo, se verifica que las condiciones operatorias garanticen una buena disolución y una buena conservación del producto acabado.

Hoy en día, existen ya liofilizadores con dispositivos neumáticos de cierre de viales en el interior de la cámara de liofilización, cerrando al vacío.

7.3 Contenido residual de disolvente:

El término humedad residual es muy limitado, puesto que sólo se aplica a los vehículos acuosos. El porcentaje de humedad residual influye en la estabilidad del liofilizado durante el almacenamiento. Cuando el vehículo es agua, la estabilidad generalmente es inversamente proporcional a la humedad residual.

Por contra, ciertos productos, como proteínas, levaduras,

exigen la presencia de una cierta tasa de humedad residual para conservar sus cualidades iniciales.

El porcentaje de vehículo residual óptimo es pues esencialmente función de la naturaleza del producto a liofilizar, debiendo de establecerse el compromiso más armónico posible entre las exigencias de estabilidad y el coste de la prolongación de la liofilización.

En el caso de vehículos acuosos se admite que la tasa de humedad residual puede situarse entre el 1 y el 5%, corrientemente pero, es imposible fijar una norma universal. La apreciación de la tasa de vehículo residual es delicada, en particular en el caso de vehículos acuosos, en efecto, esta medida depende a la vez del tipo y de las precauciones tomadas y de la técnica de dosificación. Esta determinación es relativa sin valor absoluto, siendo necesario a menudo técnicas corrientes (Karl Fisher, conductimetría, etc) para obtener un máximo de sensibilidad para cada caso particular. La técnica elaborada deberá ser entonces codificada para que sean comparables las sucesivas determinaciones.

El aumento de la tasa de humedad residual puede ser debido a:

- cerrado defectuoso
- fisura de vidrio
- reacción interna con liberación de agua

7.4 Velocidad de redisolución:

El tiempo o velocidad de redisolución es un test muy importante, y es además uno de los criterios físicos más importantes a condición de que la presencia de burbujas o espuma no impida apreciar la disolución.

A temperatura ambiente y bajo ligera agitación, el tiempo medio de redisolución es de 1 minuto y no debe de pasar de 2 minutos. El tiempo de reconstitución de una suspensión puede ser al contrario más largo, pudiéndose hablar entonces de rehidratación.

7.5 Riqueza:

Un sólo test es imperativo de calidad, el título. La comparación de títulos efectuados en el curso de diferentes etapas, permite calcular las pérdidas y preveer modificaciones a aportar.

7.6 Control de vacío:

Es necesario para los envases cerrados a vacío. Es efectuado mediante detectores de alta frecuencia y permite controlar el 100% sin deterioro de contenido.

7.7 Esterilidad:

La liofilización requiere, en el caso de un producto liofilizado estéril, una asepsia total, por lo que deben de tomarse el máximo de precauciones.

7.8 Control de pH:

El control de pH es necesario cuando se trabaja con determinados principios activos, debido a que se reduce ligeramente durante el proceso de la liofilización. Lo que puede dar lugar a fenómenos de inestabilidad química.

7.9 Grado de transparencia o Clarity Test (47):

Para verificar este test primeramente, debe de reconstituírse la solución en el mismo recipiente que contiene la forma farmacéutica seca estéril del laboratorio y determinar lo siguiente:

- El sólido debe de disolverse completamente, no debiéndose de observar ningún tipo de residuo ni partícula no disuelta.
- La solución reconstituída no debe de ser significativamente menos clara que un volumen igual del disolvente o de agua purificada contenida en un recipiente similar y observada de la misma manera.

7.10 Partículas extrañas (47):

Reconstituída la solución de la misma manera que en el punto anterior, ésta debe de estar libre de partículas extrañas que puedan ser observadas a simple vista.

7.11 Estabilidad acelerada:

Es necesario como toda forma farmacéutica, realizar un estudio de estabilidad a fin de estimar su plazo de validez.

8. Procedimientos de obtención de antibióticos beta-lactámicos solubles:

Los antibióticos beta-lactámicos deben de prepararse como forma soluble, genralmente como sales sódicas o potásicas, para poder ser administrados parenteralmente.

Estas sales se obtienen mediante dos técnicas:

- Liofilización
- Precipitación por cambio de disolvente.

Las ventajas de la liofilización las hemos mencionado ya anteriormente, pudiendoser en medio acuoso, p. ej. cefalotina sódica, cefaloridina sódica, cefazolina sódica (48), cefalosporinas en general (49), amoxicilina sódica (50).

Por precipitación, ampicilina y amoxicilina sódicas ó potásicas (51, 52) (Fig 9).

Todos los antibióticos beta-lactámicos pueden obtenerse por liofilización o precipitación en el medio adecuado. Normalmente se emplea la liofilización, pero hoy en día para algunos antibióticos que presentan problemas de reacciones de polimerización en medio acuoso, como la ampicilina y la amoxicilina, se obtienen preferentemente por precipitación por cambio de disolvente, en las que las reacciones de polimerización se presentan en mucho menor grado, por realizarse en presencia sólo de la mínima cantidad de agua, su agua de cristalización.

Nosotros hemos empleado en nuestro estudio sobre la amoxicilina ambas técnicas , de todo ello haremos incapié más

adelante.

En la fig. nº 9 . se observa un dispositivo a escala industrial de precipitación por cambio de disolvente.

Especificaciones del dispositivo:

1. Depósito solución
2. Filtro estéril
3. Suspensión
4. Centrífuga
5. Secado lecho fluído
6. Salida aire
7. Ciclón
8. Producto
9. Molino mezclador
10. Entrada aire seco
11. Prefiltro
12. Filtro estéril
13. Aréa estéril
14. Máquina envasado
15. Viales estériles

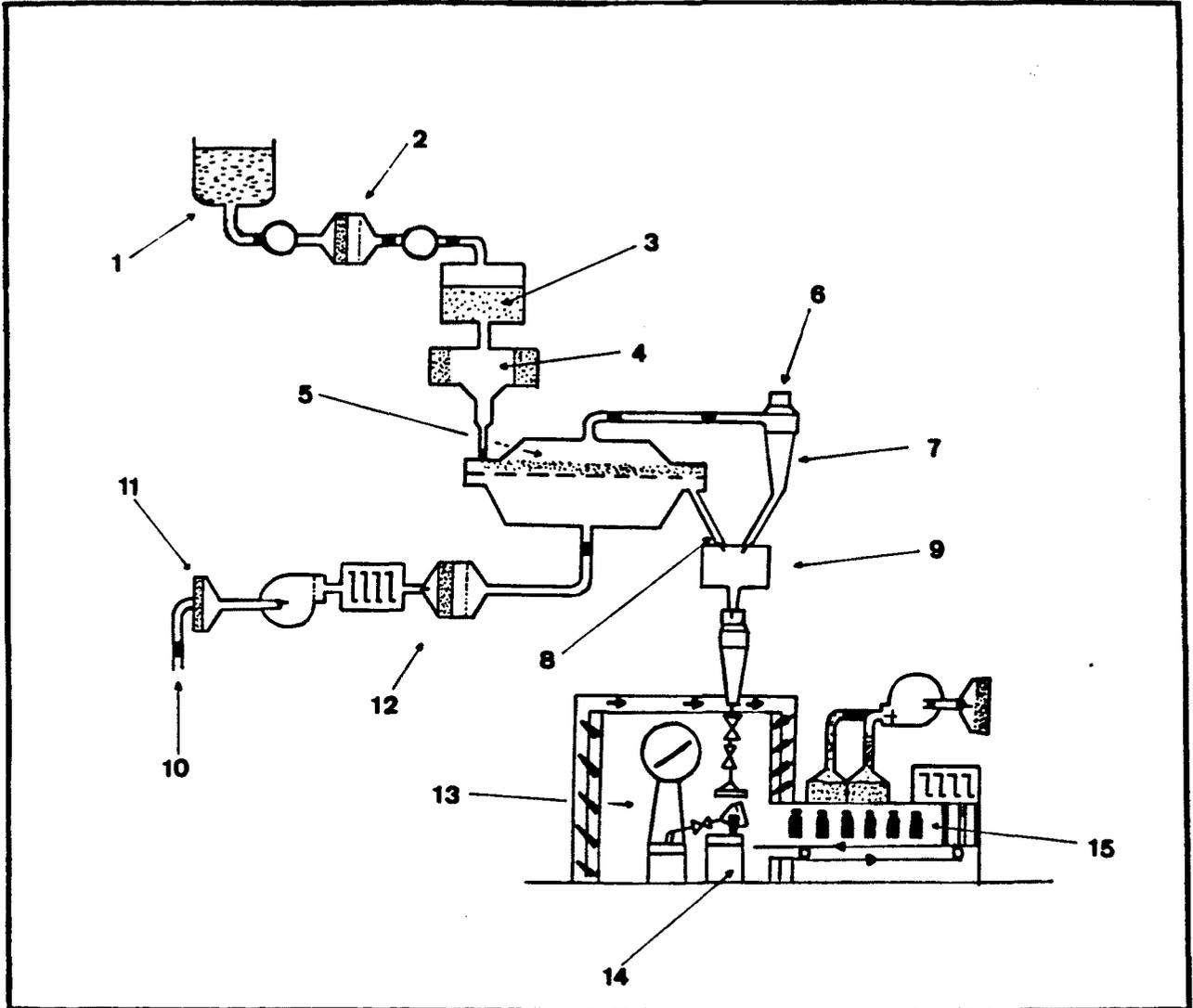


Figura nº 9. Proceso de precipitación para la obtención de productos parenterales.

9. Generalidades de cinética química:

La inclusión de este pequeño capítulo de Cinética Química, tiene por objeto, explicar, los métodos que hemos seguido en el estudio de estabilidad que realizamos en la parte experimental, dado el gran interés que supone, el estudio de la inestabilidad de estas sustancias medicamentosas.

9.1 Inestabilidad química de medicamentos:

Se denomina inestabilidad química de medicamentos a la descomposición de un principio activo durante el período de almacenamiento, con la consiguiente aparición del producto o productos de descomposición. Las vías de degradación son los procesos a través de los cuales tiene lugar la descomposición de un principio activo. y entre las mismas podemos citar:

- Hidrólisis
- Oxidación
- Fotólisis
- Racemización
- Descarboxilación
- polimerización
- Descomposición enzimática
- Reacción de Maillard

La importancia que tienen la hidrólisis, la polimerización y la degradación enzimática en la descomposición de los antibióticos betalactámicos, y más concretamente de la amoxicilina sódica, objeto de nuestro estudio, explica que de todas

las vías de degradación sean las antes mencionadas las que se consideran en relación con los procesos de degradación de dicho principio activo.

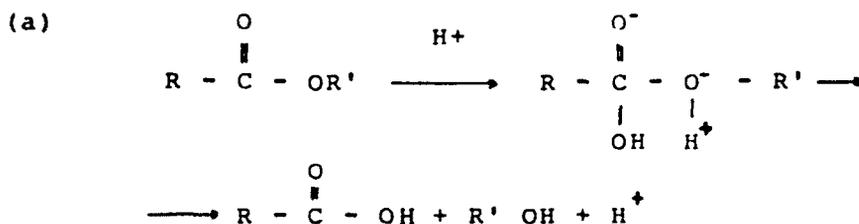
9.1.1 Hidrólisis:

La reacción de hidrólisis es una de las mejor estudiadas desde el punto de vista cinético, aunque por la dificultad de comprobación completa de los estados intermedios, se dan como probables distintos mecanismos.

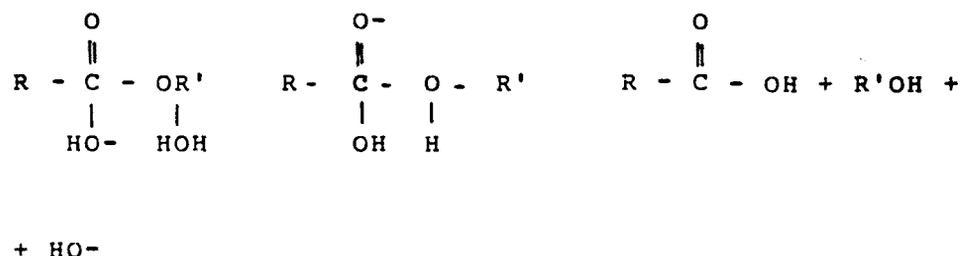
Desde el punto de vista de la estabilidad de medicamentos, la hidrólisis constituye una de las reacciones que tiene más importancia, ya que son muchas las sustancias con poder terapéutico, hidrolizables.

La hidrólisis de una molécula lleva consigo la ruptura de un enlace covalente. Aunque algunas hidrólisis pueden tener lugar con agua pura, la mayoría de las veces ocurren por efecto de una reacción catalítica que desencadena y sostiene la reacción.

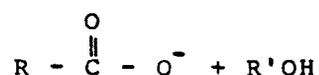
Supuesto el caso de, la catálisis específica de ésteres carboxílicos, en general se acepta las expresiones siguientes del mecanismo de la hidrólisis, según el pH ácido (a) o alcalino del medio (b):



(b)



El resultado final en medio alcalino no es b) exactamente sino:



porque con el álcali del medio se forma la sal del ácido.

De todo lo anterior se deduce, como es lógico, que la velocidad de hidrólisis depende entre otros factores, del orden de reacción, de la constante de la velocidad de reacción, de la temperatura, del pH del medio y de la presencia o ausencia de catalizadores. En el caso de formas farmacéuticas sólidas, la velocidad de hidrólisis y la extensión o cuantía en que esta tiene lugar depende también de la humedad residual (53).

9.1.2 Polimerización:

En ocasiones pueden ser importantes los fenómenos de isomerización que consisten en la transformación de una sustancia, con poder terapéutico, en un isómero con la misma estructura global pero inactivo, o menos activo.

Pueden también combinarse dos o más moléculas para formar un polímero. Frecuentemente este fenómeno no aparece como causa inicial de la alteración del medicamento, pero ayuda a la degradación de los productos primarios de descomposición.

Esto es especialmente importante en el caso de las penicilinas, fundamentalmente en la amoxicilina sódica, como veremos más adelante (107).

9.1.3 Degradación enzimática:

Una última dificultad adicional surge por la intervención de enzimas degradantes característicos de una especie o género, capaces de inactivar un antibiótico antes de que alcance su objetivo. Las betalactamasas catalizan la hidrólisis del enlace amida del anillo betalactámico de las penicilinas, destruyendo de modo irreversible el anillo beta-lactámico esencial para la actividad bactericida (54).

9.2 Predicción de estabilidad:

El conocimiento de la estabilidad de los medicamentos es de suma importancia para la industria farmacéutica. Hasta el año 1.956 el método que se empleaba consistía en la simple observación y control analítico, durante el período aproximado de un año, del medicamento mantenido en las mismas condiciones que sería almacenado.

A pesar del alto grado de seguridad que presenta este méto-

do, se comprende fácilmente que es sumamente antieconómico y sólo tiene interés para los medicamentos muy poco estables.

Desde que Garret y Carter (55, 56) aplicaron la cinética al estudio de la estabilidad se recurre a lo que se llama "envejecimiento acelerado" que permite preveer la estabilidad. Para ello se somete el medicamento a varias temperaturas, superiores a la ambiente, con lo que, según la ecuación de Arrhenius, aumenta la velocidad de reacción y por lo tanto puede hacerse la experimentación en poco tiempo. Los resultados obtenidos se extrapolan a la temperatura ambiente y por último se calcula el tiempo de validez.

Este método de degradación térmica tiene la ventaja de que no es necesario saber el mecanismo de la reacción, y en el caso de preparados complejos, en los que es difícil el análisis del principio activo, para ver la velocidad de desaparición, puede resolverse el problema detectando la variación con el tiempo de una característica físico-química que sea función de la concentración.

La elección de las temperaturas, aspecto de gran interés, depende de la naturaleza de la sustancia, que no debe fundir ni volatilizarse, y de la velocidad de reacción.

Esta técnica no puede usarse cuando se trata de sustancias que, como las proteínas, se desnaturalizan por el calor, ni para preparados como emulsiones, suspensiones, pomadas, etc, que pueden manifestar alteración del equilibrio de fases.

El método experimental más exacto para determinar la estabilidad, aplicando la degradación acelerada, es el método isotérmico (57, 58).

Para la determinación de los valores de las constantes específicas a distintas temperaturas se colocan las sustancias en termostatos a temperatura cte superior a la ambiente, se toman periódicamente muestras de las mismas y se efectúan las determinaciones analíticas. Los termostatos deben ser de circulación forzada para asegurar la uniformidad de temperatura en su interior. Es importante que la regulación térmica de cada termostato sea lo más precisa posible, por ej., $\pm 0,1^\circ$.

El inconveniente que tiene este método es que para obtener datos fiables hay que realizar muchas determinaciones.

9.2.1 Métodos isotérmicos :

9.2.1.1 Aplicación directa de la ecuación de Arrhenius:

Para llegar al cálculo del tiempo de validez según la degradación acelerada pueden emplearse varios métodos. Uno de ellos consiste en la aplicación directa de la ecuación de Arrhenius (57).

La manera de operar es la siguientes: se determina la concentración del principio activo en tiempos sucesivos y a distintas temperaturas. Con estos datos, si se trata de reacciones de orden cero, representaremos concentraciones de reactivo frente a tiempo ($C = C_0 - Kt$); si es de primer orden, su logaritmo frente al tiempo ($\log C = -\frac{K}{2,303}t +$

$\log C_0$) y su inversa si es de orden dos ($1/C = Kt + 1/C_0$). De esta forma obtendremos siempre una recta.

A partir de las pendientes de las rectas resultantes se

calculan los valores de k correspondientes a cada temperatura. Con estos valores se aplica la ecuación de Arrhenius representando $\log k$ frente a $1/T$, extrapolando la recta resultante podemos saber la k a cualquier temperatura generalmente a 25°C . Con este valor sustituido en la ecuación del orden de la reacción se calcula el tiempo necesario para que a 25°C se transforme el 10% de la sustancia activa y ese tiempo, será el tiempo de validez.

Conviene en todos los casos aplicar el cálculo estadístico para lo cual es necesario realizar un número adecuado de determinaciones.

9.2.1.2 Método del coeficiente de temperatura (59):

Este método resulta más simplificado que el basado en la aplicación de Arrhenius pues basta hacer las determinaciones a dos temperaturas. Uno de los motivos de simplificación consiste en suponer constante el coeficiente de temperatura.

Por definición el coeficiente de temperatura es (60) la relación entre las constantes específicas de velocidad a dos temperaturas que difieran 10°C . Suponiendo la constancia del coeficiente de temperatura a distintos intervalos se calcula el valor de k a 25°C y con este dato y la ecuación del orden de reacción, el tiempo de validez.

Varios autores (61) indican que este método da valores de tiempo de validez menores que el método anterior ya que el coeficiente de temperatura disminuye al aumentar la temperatura.

9.2.1.3 Nomogramas:

El nomograma de Lordi y Scott (62), basándose en la ecuación de Arrhenius y a partir de datos experimentales obtenidos a dos temperaturas elevadas T_1 y T_2 , expresadas en temperaturas absolutas y que cumplen la condición de $\frac{2}{T_1} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{298}$

desarrolla la ecuación : $\log t \frac{r_2}{90} = 2 \log t \frac{r_1}{90} - \log t \frac{25}{90}$

que permite la representación gráfica en un sistema de coordenadas cartesianas logarítmicas de los valores $t \frac{r_2}{90}$ y $t \frac{r_1}{90}$ deduciendo gráficamente $t \frac{25}{90}$.

El nomograma muestra pues la relación existente entre la estabilidad; a la temperatura ambiente, la energía de activación y las velocidades específicas de degradación a dos temperaturas elevadas, sin embargo es solamente aplicable a reacciones de orden 1. Se emplea cuando no se requiere gran precisión.

Lingsch y col., (58), hicieron un estudio experimental comparativo de los tres métodos - aplicación de la ecuación de Arrhenius, el uso del coeficiente de temperatura y los nomogramas - y llegan a la conclusión de que los resultados con la ecuación de Arrhenius coinciden con los reales, siendo su único inconveniente la gran cantidad de cálculos y datos que requiere. El método del coeficiente de temperatura da predicciones bastante más cortas que las reales y las cartas de estabilidad dan poca precisión. Todo ello ha sido corroborado en estudios recientes realizados en nuestro Departamento (63, 64).

9.2.2 Método no isotérmico:

Rogers (65), Eriksen y Stellmach (66) independientemente han elaborado, una serie de métodos que permiten predecir la estabilidad de un medicamento en un período de tiempo muy breve y con relativamente poco trabajo experimental, mediante los llamados programas de un sólo paso o métodos de isotérmicos de estudios de estabilidad. Este programa consiste en utilizar una temperatura programada de forma que, partiendo de la ambiente (t_0) se va elevando gradualmente hasta la temperatura final (T_t) alcanzada en un intervalo de tiempo (t). Los resultados analíticos que a intervalos iguales de tiempo se van obteniendo pueden representarse gráficamente en función del tiempo, dando una línea recta, lo que permite calcular por un lado la velocidad específica a la temperatura inicial y por otro, la energía de activación a partir de la pendiente de esta recta; con ellas se puede calcular la velocidad específica a cualquier temperatura deseada.

Robert (67) ha publicado una revisión de estos métodos no isotérmicos, los cuales pueden clasificarse en dos grupos:

- Métodos en los que la variación de temperatura es lineal con el tiempo.
- Métodos en los que la variación de temperatura no es lineal con el tiempo.

Los métodos del primer grupo tienen la ventaja de que el programador de temperatura requerido es fácilmente asequible, pero en cambio el cálculo matemático es más sofisticado. Por el contrario, los métodos del segundo grupo necesitan un pro

gramador de temperatura más sofisticado pero los cálculos consisten en una sola regresión lineal simple.

Resultados obtenidos en nuestro Departamento (68) han puesto de manifiesto que los métodos no isotérmicos dan una precisión inferior a los que se pueden obtener por métodos isotérmicos y probablemente por ello y por la dificultad que entraña disponer de un programador de temperatura no han sido usados con la profusión que podría aconsejar la realización de menos trabajo experimental.

9.2.3 Determinación de la fecha de caducidad de medicamentos mediante corto almacenamiento a la temperatura ambiente (69):

La fijación de una fecha de caducidad basada en el tiempo de vida noventa por cien (t_{90}) del principio activo, calculado utilizando la ecuación de Arrhenius, ofrece algunos riesgos, ya que pueden existir factores, entre ellos la variación del orden de reacción con la temperatura, la presencia simultánea de dos o más vías de degradación con distintos valores de energía de activación, sistemas heterogéneos (como es en nuestro caso), etc.

Tratándose de principios activos poco estables, de t_{90} corto, la determinación experimental de este carácter a la temperatura ambiente es perfectamente realizable, valorando la fórmula recién preparada y repitiendo la valoración después de transcurrido un corto período de almacenamiento a la temperatura ambiente; en estos casos, la diferencia en los porcentajes de principio activo entre las dos valoraciones

es bastante grande como para ser detectada con seguridad mediante métodos analíticos corrientes.

Pero en el caso de principios activos de mayor estabilidad, para detectar con facilidad un porcentaje mínimo de degradación es necesario dejar transcurrir un tiempo excesivamente largo en las dos valoraciones, incompatible la mayoría de las veces con las exigencias prácticas.

Para ello se efectúa una serie de N_1 valoraciones de la forma farmacéutica recién preparada, después de envejecida por un determinado período de tiempo (Δt) de almacenamiento a una temperatura constante, se efectúa una segunda serie de valoraciones N_2 , los resultados de las valoraciones se expresan en forma de porcentajes (c) sobre el valor teórico. Calculándose la media (\bar{c}) y el error tipo de cada serie. Después se evalúa la significación estadística de la eventual diferencial $\bar{c}_1 - \bar{c}_2$, mediante un test de Student. Teniendo en cuenta la sensibilidad del test "t" en función del número de elementos de que constan las muestras resulta que cuando la probabilidad P es superior al nivel de significación elegido (0,025) puede ser necesario efectuar un mayor número de valoraciones; ello no sería inconveniente si fuera suficiente aumentar N_2 pero de acuerdo con

$$a) \quad t = \frac{\bar{c}_1 - \bar{c}_2}{S_{comb} \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

puede ser necesario aumentar también N_1 para conseguir un valor de "t" suficientemente alto, no siendo posible una vez envejecida la forma farmacéutica.

Por todo ello, antes de iniciar el trabajo experimental debe de conocerse:

- 1.- El número de valoraciones a efectuar sobre la forma farmacéutica recién elaborada (N_1).
- 2.- El porcentaje de degradación mínima que se debe poner de manifiesto.
- 3.- El nivel de significación (P) de llegar a una conclusión errónea por defecto.
- 4.- El período de envejecimiento (Δt) que deberá dejarse transcurrir entre las dos series de valoraciones.

1. El número de valoraciones a efectuar sobre la forma farmacéutica recién elaborada se calcula a partir de a) mediante:

$$b) \quad N_2 = \frac{t^2 \cdot s_1^2}{d^2 - \frac{1}{N_1} \cdot t^2 \cdot s_1^2}$$

donde

$$d = \bar{c}_1 - \bar{c}_2$$

s_1 = error tipo de N_1

t = "t" de Student

Sin embargo no es posible utilizar esta forma a priori para calcular N_2 . Por ello se efectúan 10 valoraciones sobre

una parte alícuota de la forma farmacéutica recién elaborada, se halla su error tipo, se elige el nivel de significación determinando el valor de "t" para 9 grados de libertad; es decir, la diferencia d que deberá ponerse de manifiesto y con todos estos datos se aplica b).

2. El porcentaje de degradación a poner de manifiesto se halla mediante.

$$\frac{5 \text{ años}}{10 \%} = \frac{\Delta T}{d}$$

de donde expresando el tiempo en meses resulta:

$$d = \frac{1}{6} \cdot \Delta T$$

3. Nivel de significación

El umbral del 0,05 se admite en numerosos campos experimentales, pero se considera que en un estudio de estabilidad del que pueden derivarse serios perjuicios al consignar fechas de caducidad erróneas posteriores a las reales, se adopta generalmente el umbral 0,025.

4. Tiempo de envejecimiento

El tiempo de envejecimiento (ΔT) debe de decidirse en función del error tipo del método analítico disponible, para no incurrir en un número de valoraciones impracticable

cuanto menor sea el error tipo, más corto podrá ser el período de envejecimiento.

Finalmente se calcula el valor más probable de t_{90} mediante

$$\frac{C_1 - C_2}{\Delta T} = \frac{10}{t_{90}}$$

ecuación que figura en diversos textos de estadística. Pero cuando se utiliza una recta de regresión de Y en X para el capítulo del valor de X correspondiente a un Y dado (cual es el caso del cálculo de un t_{90}) se acostumbra a establecer los límites de confianza del valor de X mediante:

$$X_{\text{real}} = X_{\text{calc}} \pm \frac{t.s}{b} \sqrt{\frac{(X_{\text{calc}} - \bar{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2} + \frac{1}{N} + 1}$$

pero cuando la pendiente de la recta de regresión es pequeña en comparación con el error tipo del método analítico, como en el caso de degradación-tiempo, los límites de confianza conviene calcularlos por la fórmula general:

$$X_{\text{real}} = X_{\text{calc}} + \frac{(X_{\text{calc}} - x)g \pm \frac{t.s}{b} \sqrt{\frac{(X_{\text{calc}} - \bar{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2} + \left(\frac{1}{N} + 1\right)(1-g)}}{1 - g}$$

10. Generalidades del trihidrato de amoxicilina:

10.1 Introducción:

La amoxicilina es la 6-(α -amino-4-hidroxifenil acetamida) del ácido penicilánico, la encontramos en algunos trabajos como la para-hidroxi ampicilina. Pertenece al grupo de las penicilinas semisintéticas sensibles a la acción de la penicilasa y que se absorben por vía oral (Fig.10).

La primera patente de la amoxicilina aparece en 1.964 (70). Se han obtenido sintéticamente distintos derivados, pero la forma que se usa es el trihidrato.

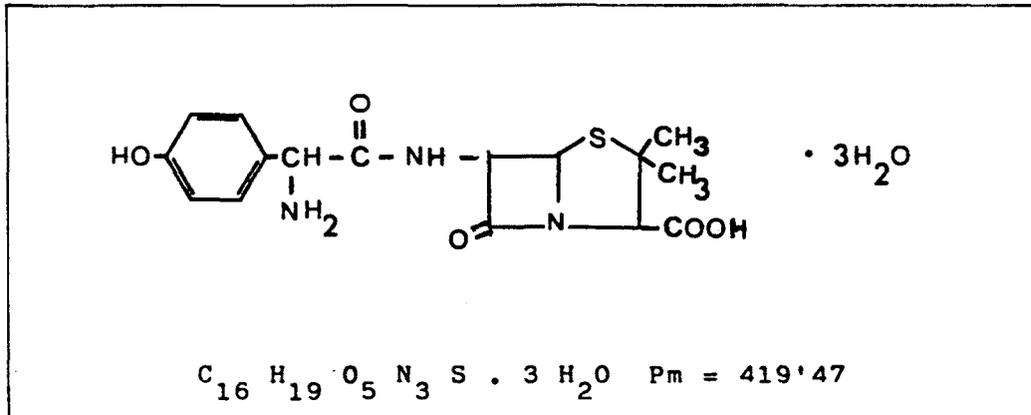


Figura n° 10.

La amoxicilina tiene propiedades químicas y farmacológicas semejantes a la ampicilina (sólo se diferencian en el grupo hidroxilo en posición para), siendo absorbida de manera más rápida y completa en el tracto gastrointestinal que la ampicilina, es ésta la mayor diferencia entre las dos penicilinas.

Como la ampicilina, el epímero S del C₁₀ obtenido también por síntesis, muestra una actividad antibacteriana menor. El isómero para "in vivo" es el que alcanza niveles hemáticos más altos.

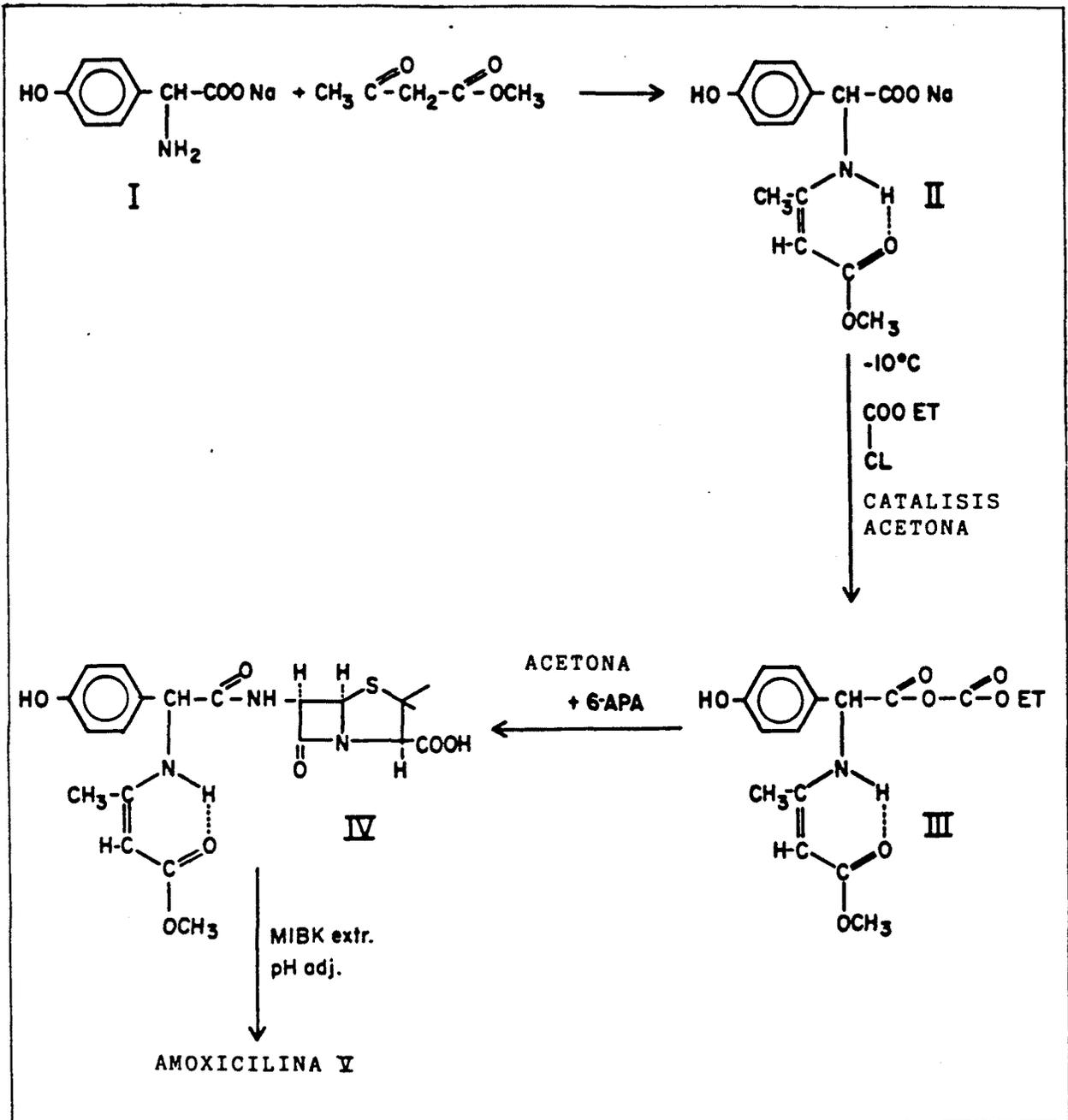
10.2 Síntesis:

Se calienta la sal sódica del ácido α -amino-p-hidroxifenil acético con metil aceto-acetato produciéndose el compuesto **II** que se cristaliza en metanol. Se trata con cloroformiato de etilo, que da el compuesto **III**, el cuál se hace reaccionar con el 6-APA para dar IV, y por fin se libera la amoxicilina a pH apropiado; se cristaliza, se lava con acetona y se seca (71) (ver cuadro nº 7).

10.3 Propiedades físico-químicas:

La amoxicilina es un polvo microcristalino inodoro, de color blanco o casi blanco.

- Solubilidad. Es soluble en 400 partes de agua, en 1000 partes de alcohol (95%), y en 200 partes de alcohol metílico, podemos considerarla insoluble en cloroformo, éter y aceites.



Cuadro n° 7 : Proceso de síntesis de la amoxicilina trihidrato.

- Acidez. Una solución de amoxicilina en agua, en una proporción aproximada del 0'2 %, nos da un valor de pH comprendido entre 3,5 y 5,5. La acidez es como la de la ampicilina (72), y en general, como todas las que tienen el grupo carboxilo libre.

- Humedad. Se considera una cantidad de agua entre el 11'5 y 14'0 % (peso/peso). La cantidad teórica para el trihidrato es 12'84 %.

- Rotación específica. Una solución al 0'2 % de amoxicilina en agua debe dar un valor comprendido entre + 290°C y + 310°C. El poder rotativo es positivo como es característico de todas las penicilinas.

- Absorción en el ultravioleta. El espectro en el ultravioleta corresponde a la estructura de su cadena lateral, puesto que ya dijimos que el núcleo común a todas las penicilinas, el ácido 6-APA, no da bandas de absorción. Por lo tanto, las bandas de absorción son debidas al núcleo bencénico con la influencia del resto de la molécula y la variación, según la polaridad de los disolventes, es debida a la presencia del grupo - OH fenólico ionizable. El espectro en ácido clorhídrico presenta un máximo a 272 nm y otro, a modo de hombro, a 278 nm. En el agua el espectro es igual al que se obtiene en ácido clorhídrico.

En etanol y metanol presentan el máximo a 274 nm, y el hombro ligeramente menos acentuado a 281 nm. En potasa hay un marcado corrimiento batocrómico del máximo (291 nm), un aumento considerable de la extinción y prácticamente desaparece el residuo debido a la estructura fina o vibratoria (71).

Se cumple pues el efecto previsto por la presencia del gru-

po fenólico. En la serie de disolventes empleados se ve la tendencia al corrimiento batocrómico del máximo y a la desaparición de la banda debida a la estructura fina o vibratoria, llegando al efecto extremo en medio alcalino debido a la interacción entre el anión (por la ionización del fenol) y el disolvente (73).

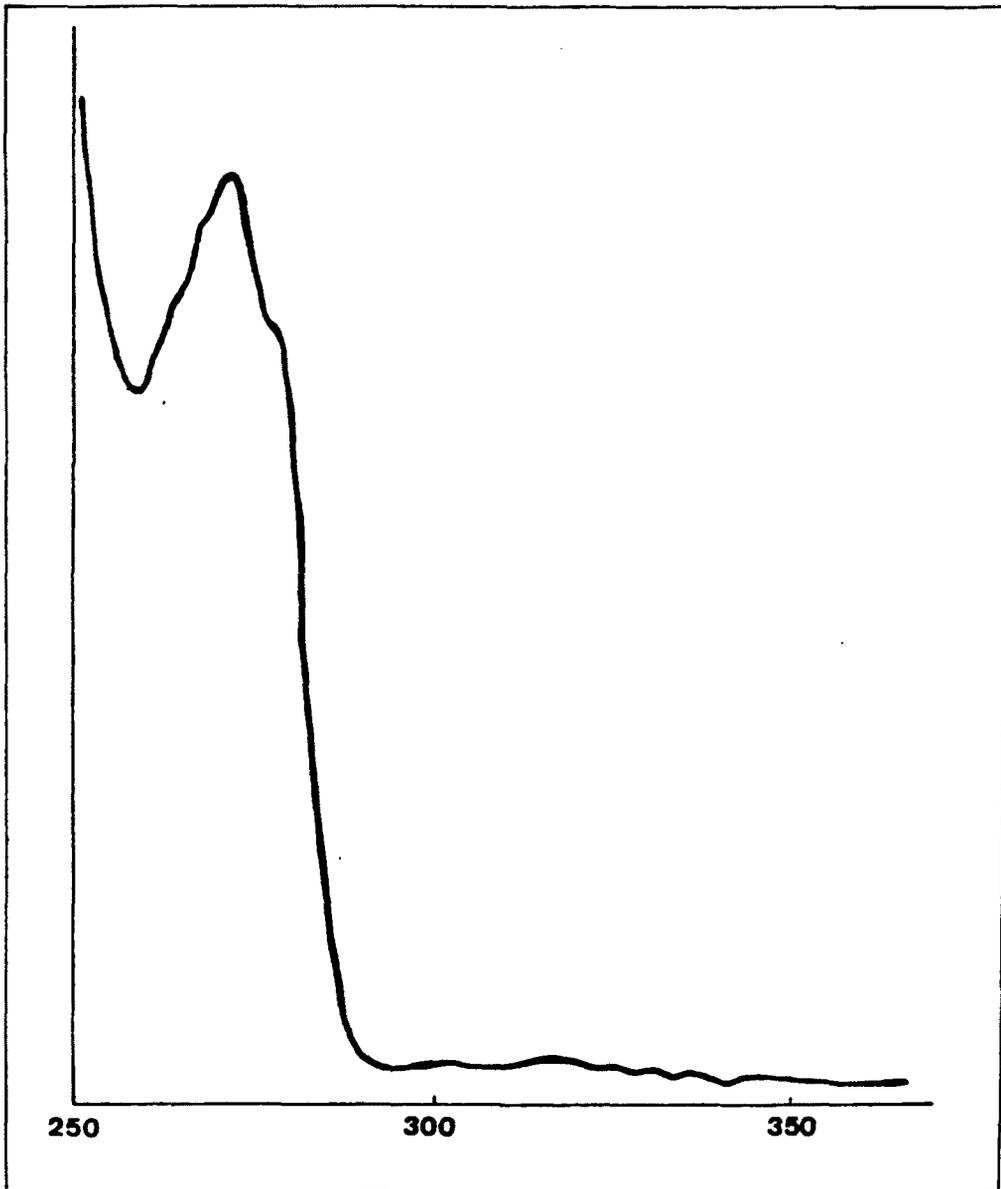
Los valores del $E_{1\%}$ son de : 25'74, 20'61, 33'18, 25'92, y 72'03 para los espectros en agua, ácido clorhídrico, etanol, metanol y ptasa, respectivamente.

Los espectros de las disoluciones de amoxicilina en los diferentes disolventes están recogidos en las gráficas 4-8 de las páginas 98 - 102 .

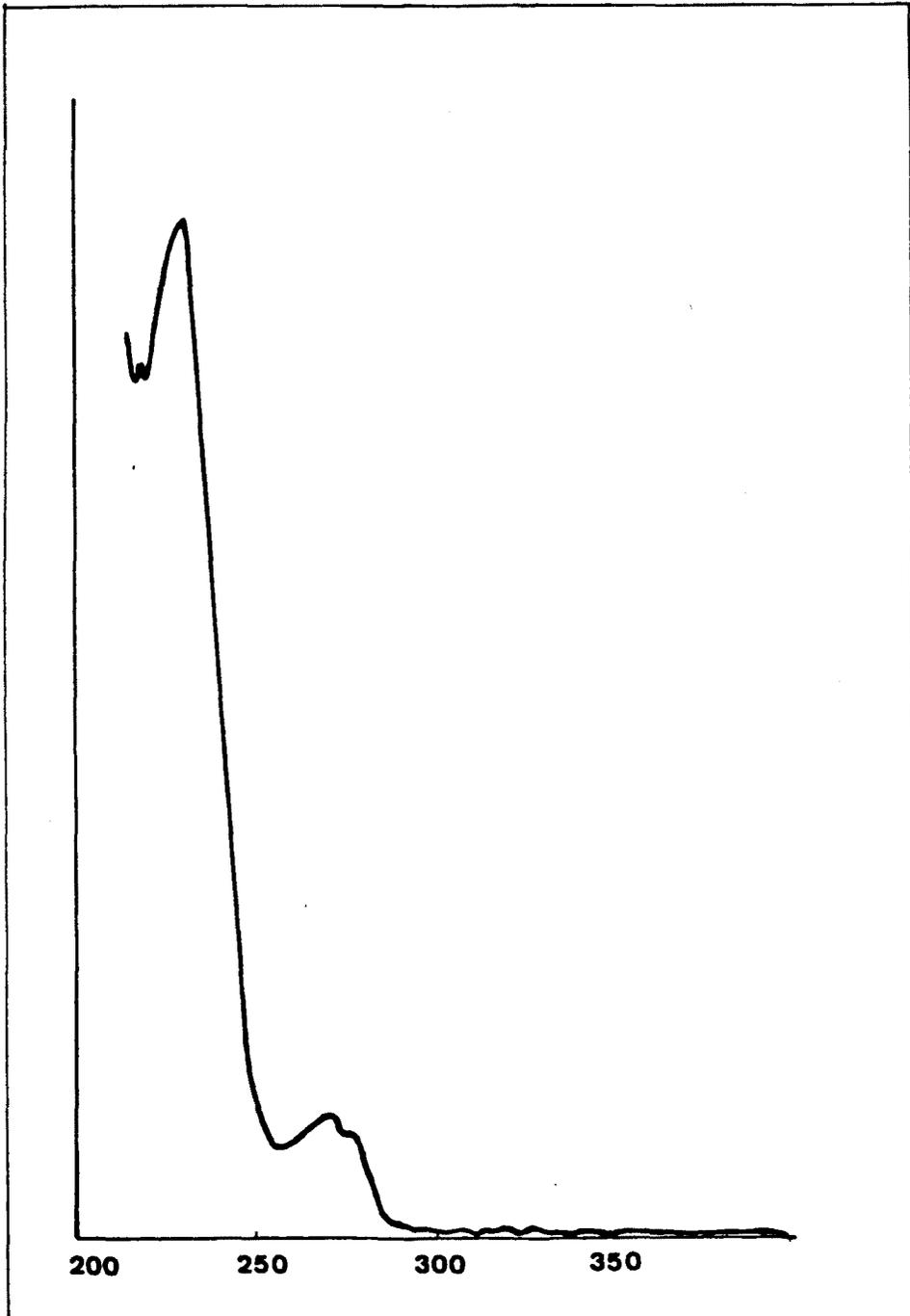
- Absorción al infrarrojo. Dada su especificidad, los espectros IR se utilizan para la identificación de las penicilinas y para comprobar la integridad del anillo betalactama. Este método ha sido adaptado por la British Pharmacopoeia 1.982 en las monografías de las penicilinas.

En el espectro IR de la amoxicilina (71), obtenido con pastilla de KBr, aparecen las bandas propias de todas las penicilinas, como son: a 1176 cm^{-1} la del anillo betalactama, a 1582 cm^{-1} la del carboxilo, a 1168 cm^{-1} la del grupo amida lateral. Como características de la amoxilina podemos señalar: a 1519 cm^{-1} la debida al anillo aromático, entre $2500-3200\text{ cm}^{-1}$ la del grupo amino primario, el OH da absorción entre $3400-3550\text{ cm}^{-1}$, el benceno para-disustituido produce una banda a 850 cm^{-1} .

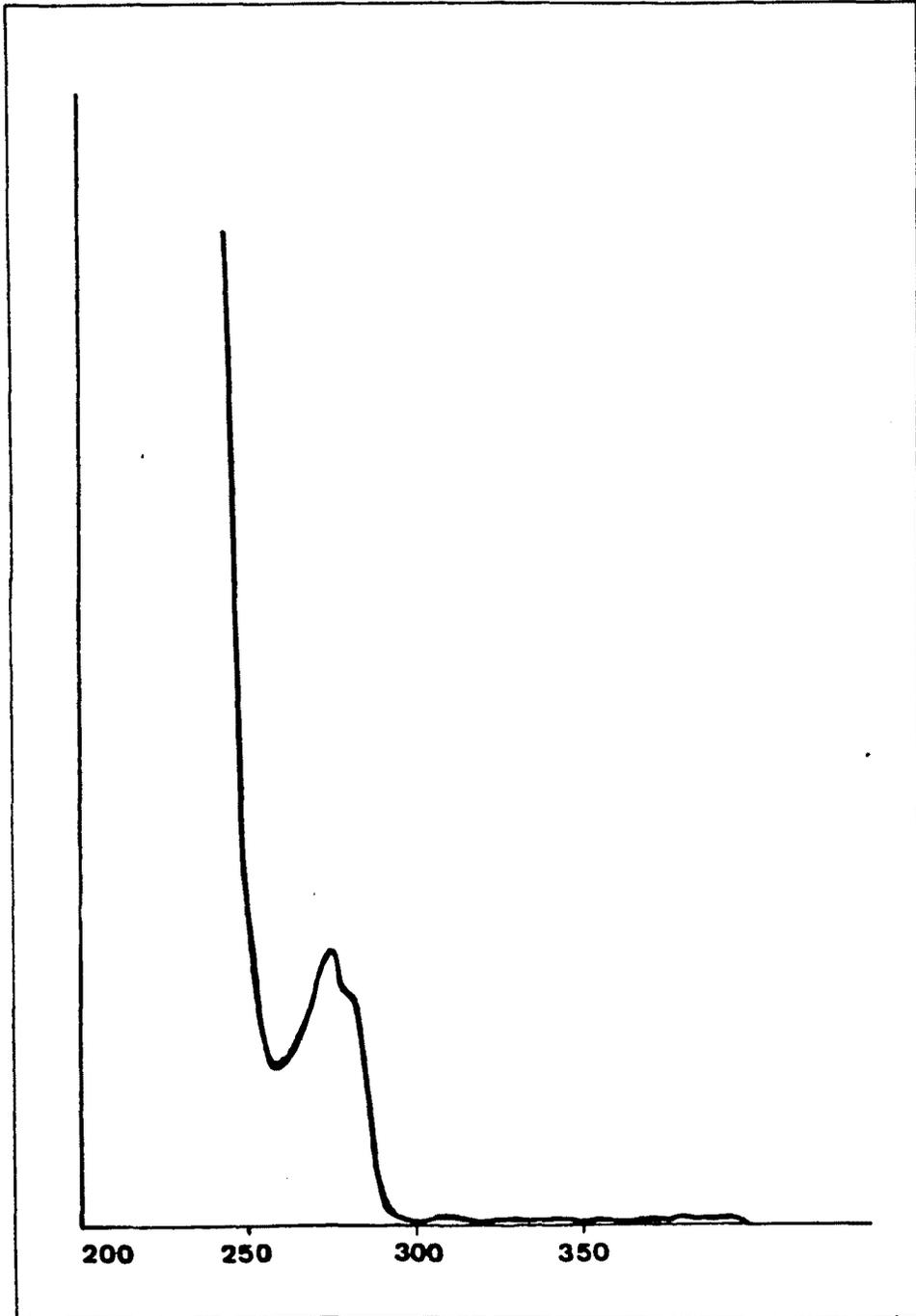
Como veremos más adelante (pág 285), nosotros hemos empleado este método cualitativamente para observar la posible degradación de la amoxicilina después de la fabricación de cada



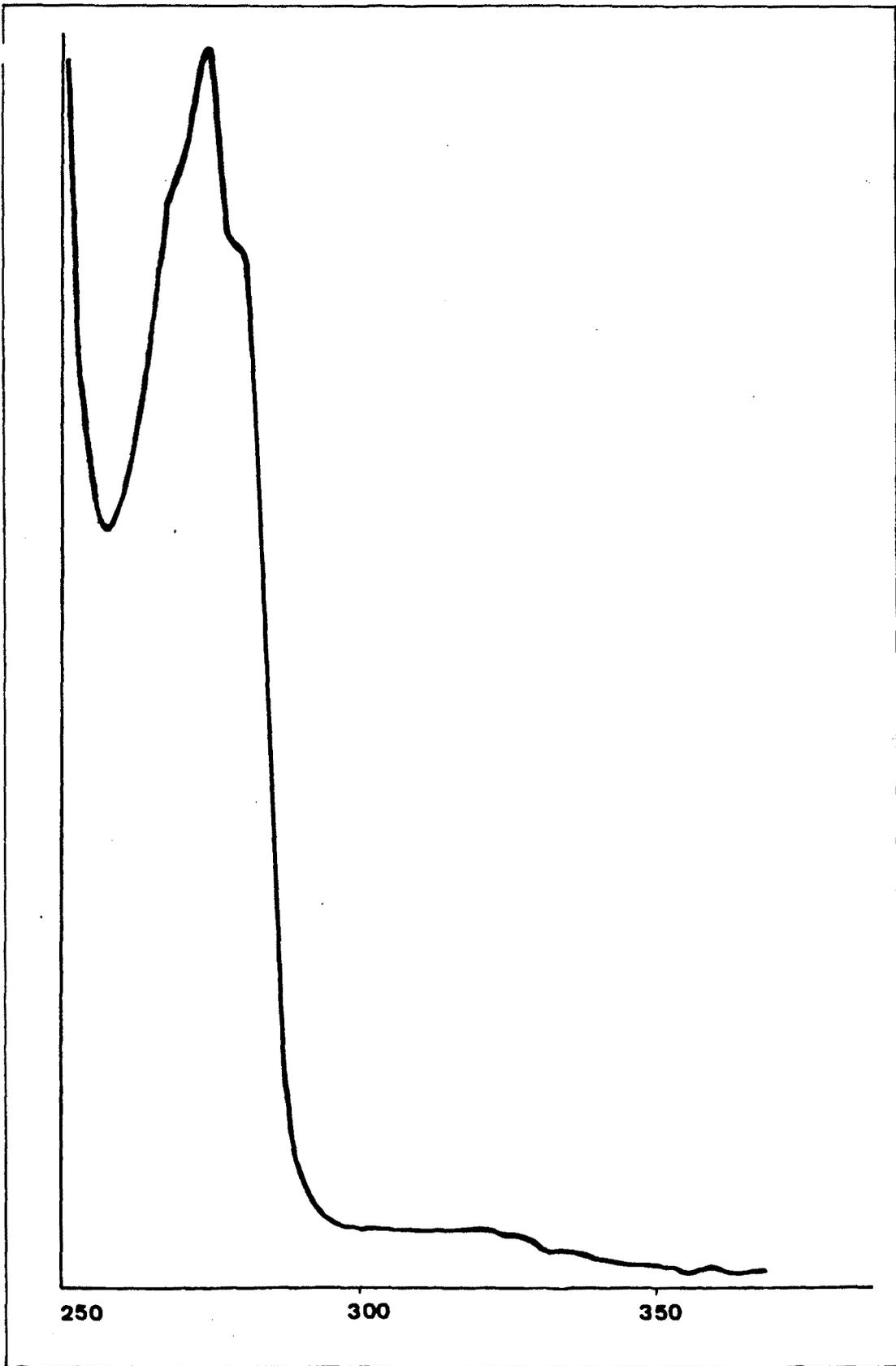
Gráfica n° 4 : Espectro UV de amoxicilina trihidrato en agua.



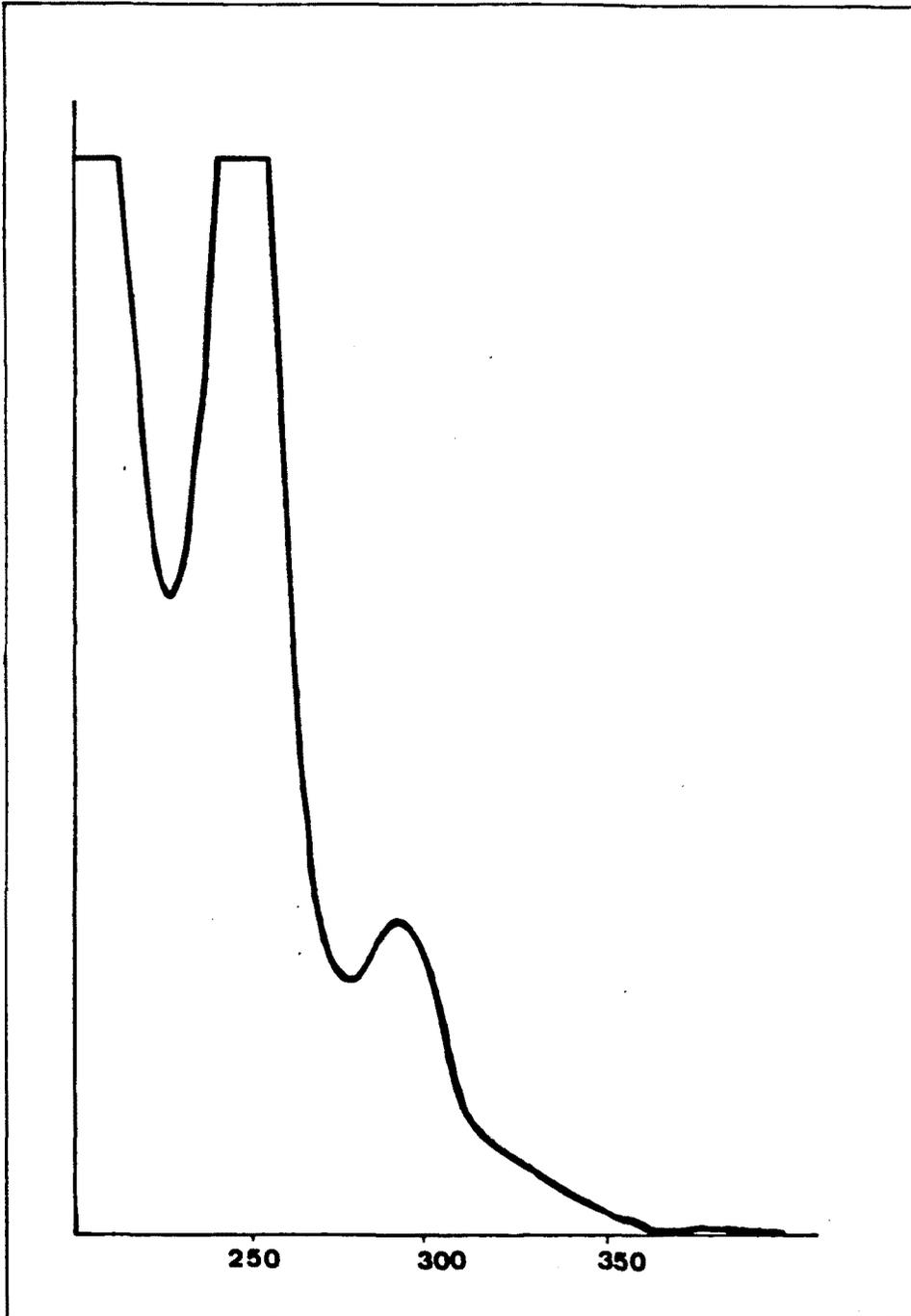
Gráfica n° 5 : Espectro UV de amoxicilina trihidrato en ácido clorhídrico.



Gráfica n° 6 : Espectro UV de amoxicilina trihidrato en etanol.



Gráfica n° 7 : Espectro UV de amoxicilina trihidrato en metanol.

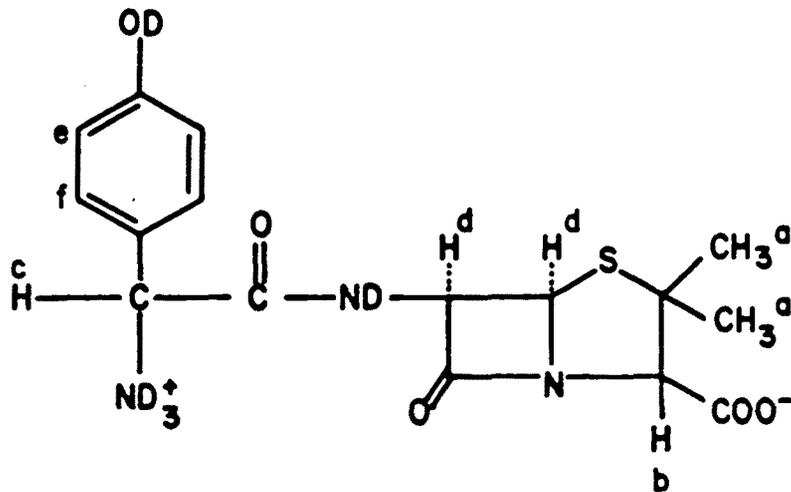


Gráfica n° 8 : Espectro UV de la amoxicilina trihidrato en potasa.

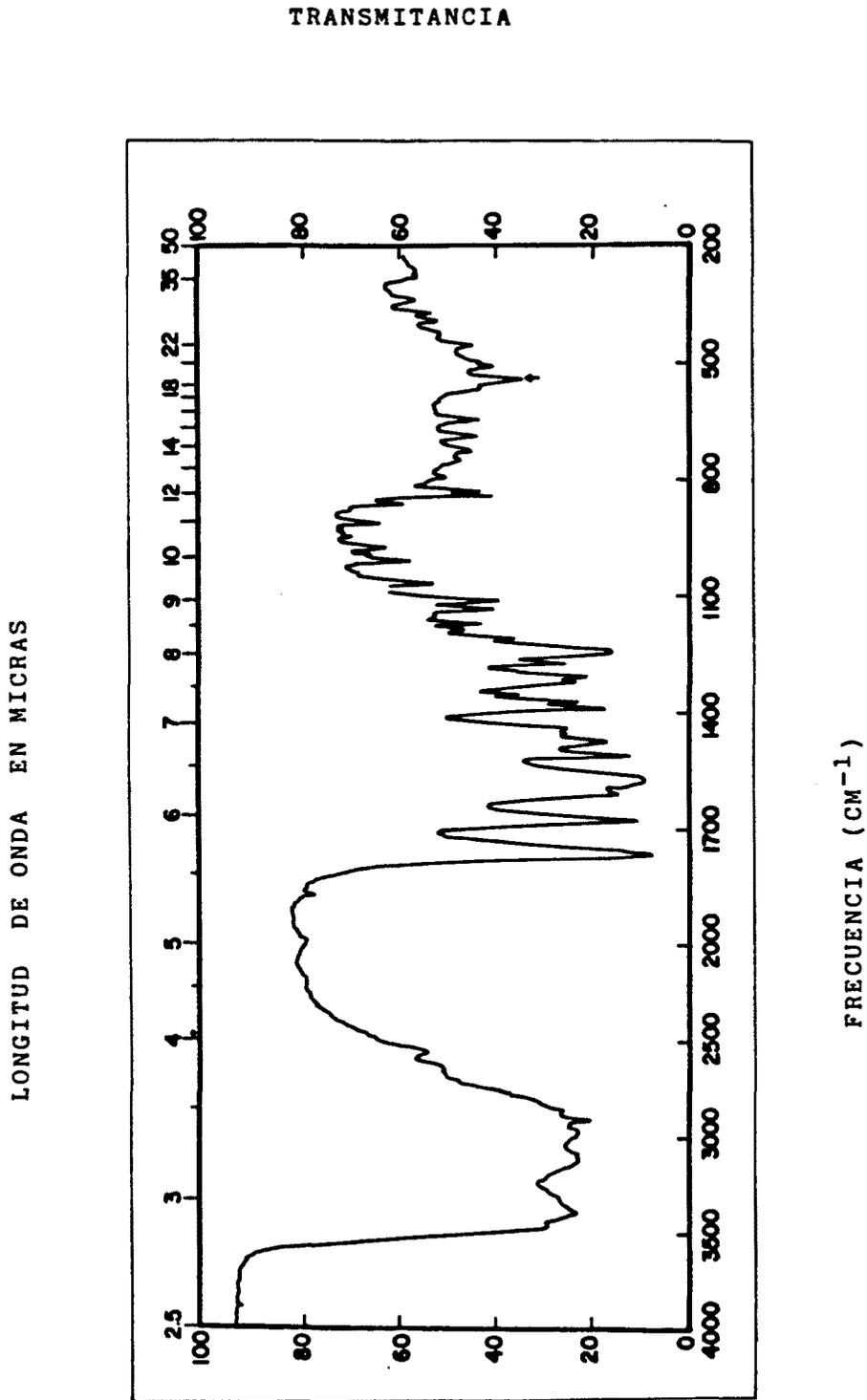
lote y para identificar los productos de degradación estudiados. En la gráfica nº 9, de la pág. 104, se muestra el espectro IR de la amoxicilina.

- Espectro de RMN. Se ha obtenido empleando una disolución de unos 50 mgs de penicilina disueltos en 0,5 ml de D_2O con unos 2 mgs, de DSS (dimetil silil propano sulfonato sódico) como standard interno (71).

El espectro obtenido es el de la gráfica 10, que puede interpretarse según la fórmula y cuadro nº 8 y es la siguiente:



Estructura de la amoxicilina

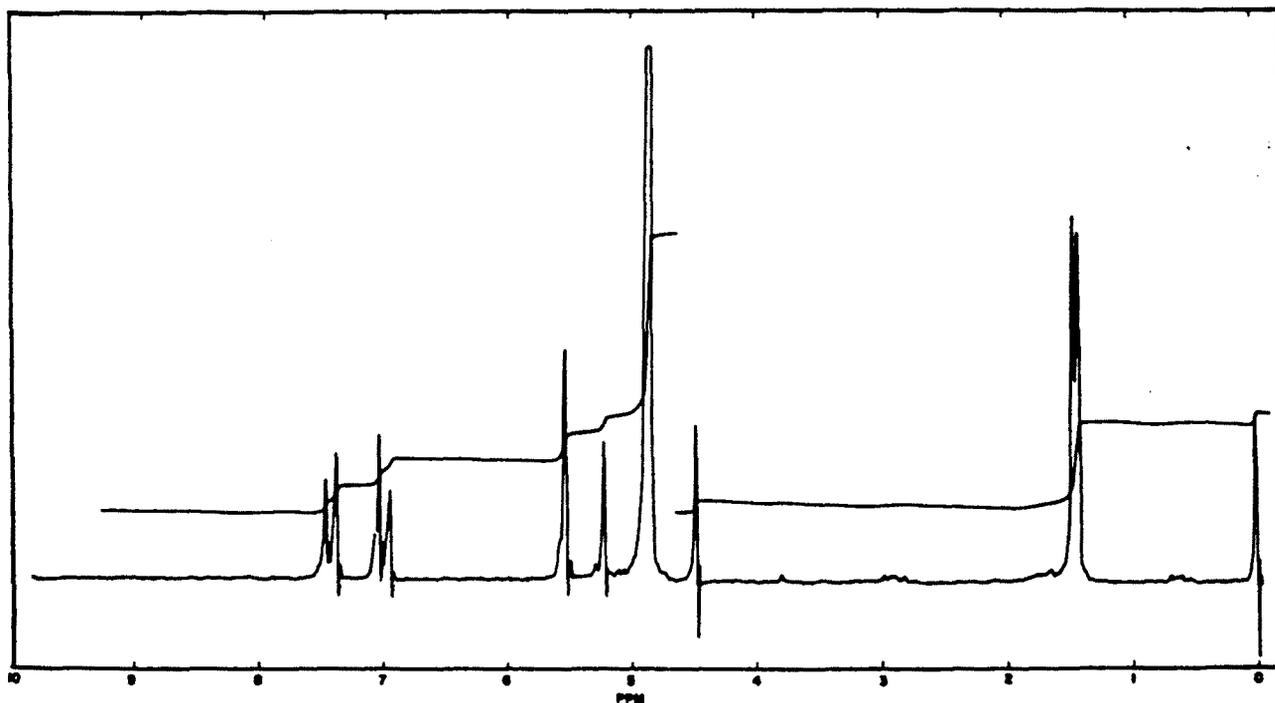


Gráfica n° 9: Espectro IR de amoxicilina trihidrato.

Cuadro n° 8.

<u>Protón asignado</u>	<u>Corrimiento químico (δ), ppm</u>	<u>Multiplicidad</u>
a	1'34 - 1'36	Singulete
b	4'40	"
c	5'14	"
d	5'64	"
e*	6'91	Doblete
f*	7'37	"

* Acoplamiento constante $J_{HH} = 9$ Hz



Gráfica n° 10 : Espectro RMN de amoxicilina trihidrato.

- Constantes de ionización. La amoxicilina, como se ve por su fórmula, pertenece a las penicilinas anfóteras, como la ampicilina.

Forma, en cuantía diferente según el pH, tres iones: el catión, el ión anfótero y el anión. (74) (75) (76) (77) (Fig. nº 11).

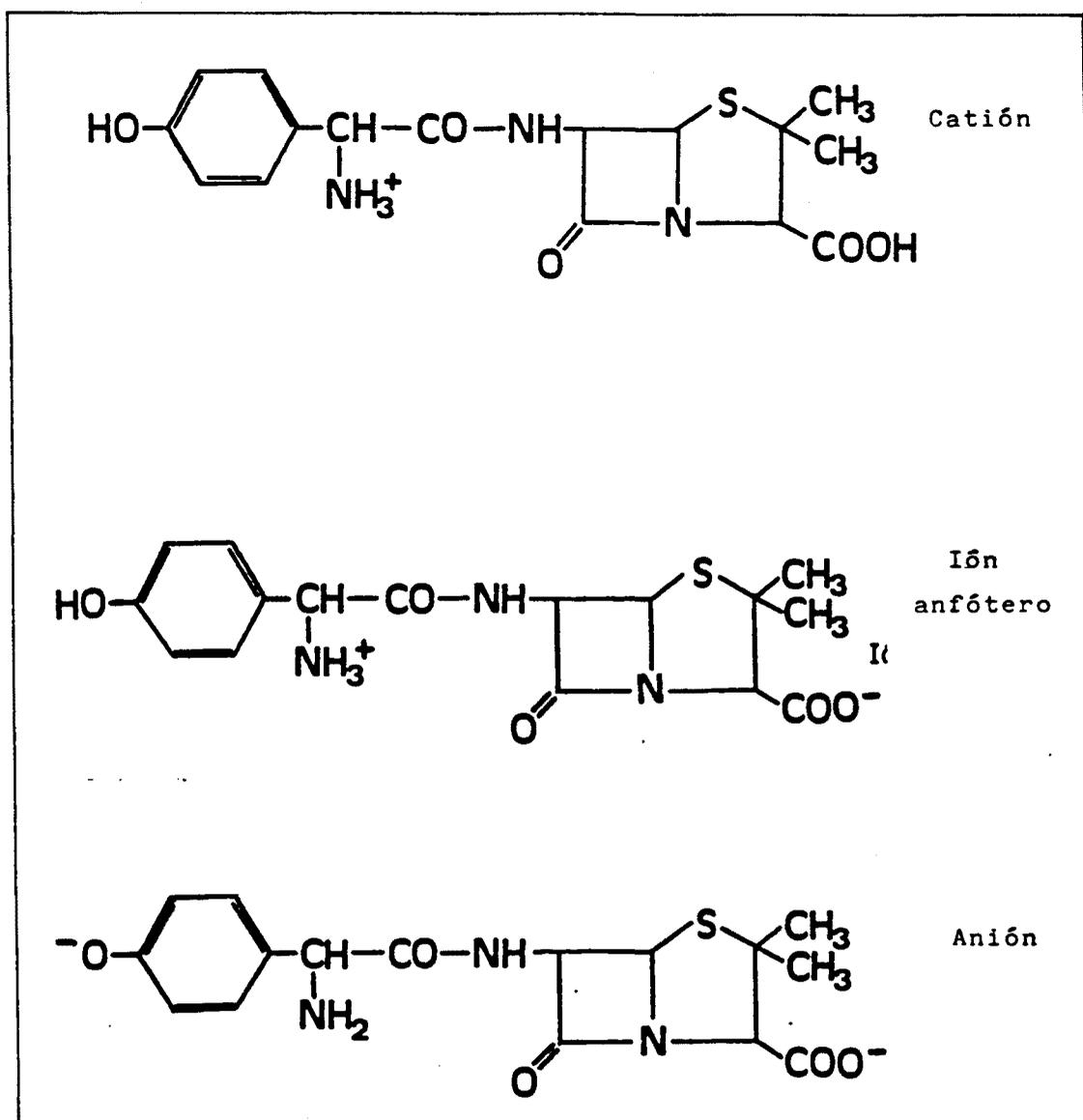


Figura nº 11.

Se han determinado los valores de las tres constantes de disociación (74):

$$K_{a_1} = \frac{(Am H_2^+) (H^+)}{(Am H_3^+)} \quad pK_{a_1} = 2'87$$

$$K_{a_2} = \frac{(Am H^-) (H^+)}{(Am H_2^+)} \quad pK_{a_2} = 7'28$$

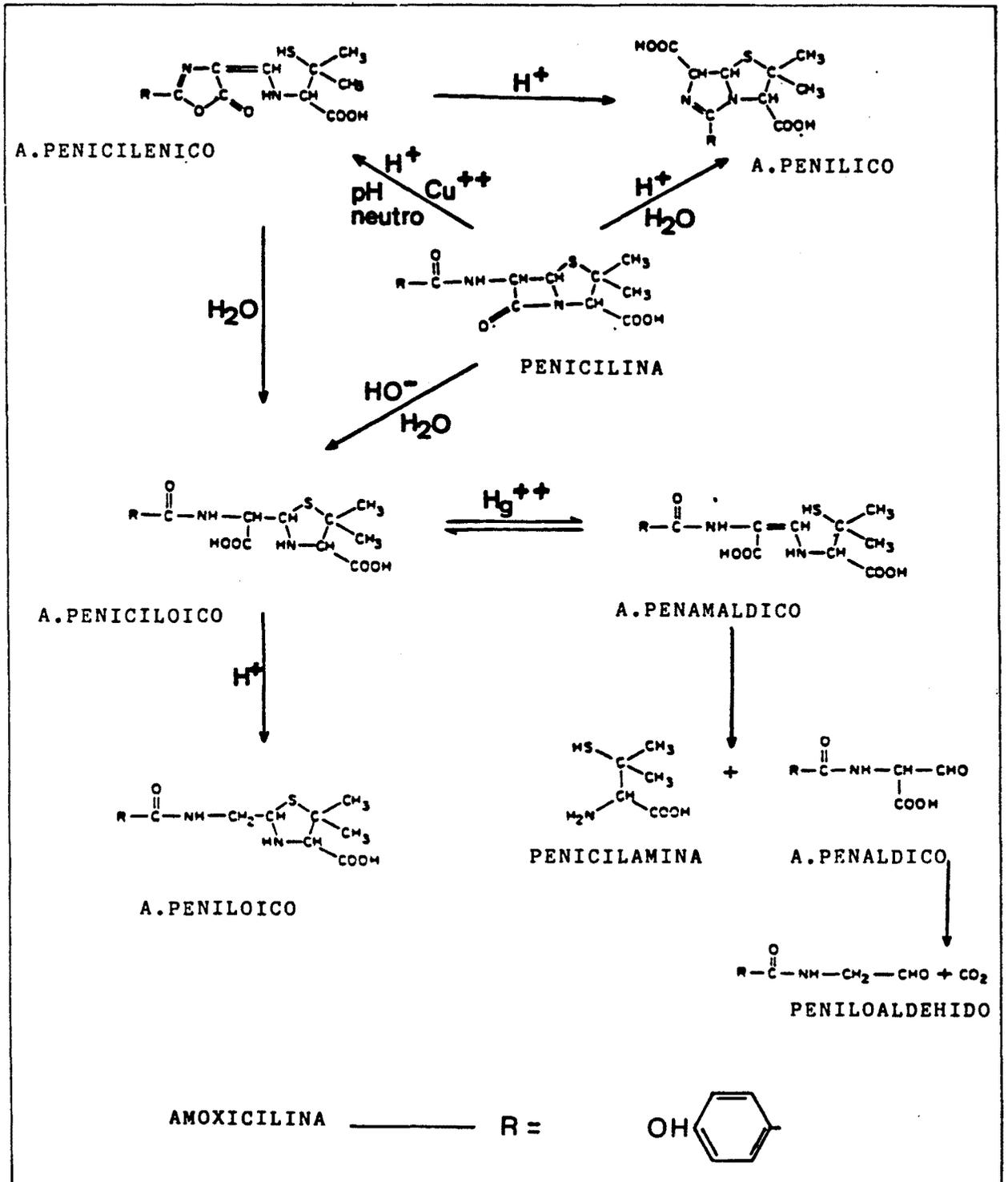
$$K_{a_3} = \frac{(Am^-) (H^+)}{(Am H^-)} \quad pK_{a_3} = 9'65$$

Como se ve, el valor de K_{a_1} es el de todas las penicilinas.

- Estabilidad. La inestabilidad de las penicilinas se conoce desde su descubrimiento. Esta inestabilidad es debida, en general, a reacciones de hidrólisis, las más importantes desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo.

La parte más lábil es el enlace betalactámico. Se han obtenido relaciones entre la estabilidad de ese anillo y la actividad antibiótica (78).

La hidrólisis (71, 74, 79, 80) de las penicilinas, se puede



Cuadro n° 9 : Degradación de penicilinas.

hacer por métodos químicos, por acción de ácidos o bases, por enzimas, como amilasas, que actúan sobre el enlace peptídico de la cadena lateral, o por betalactamasas que lo hacen sobre el anillo betalactámico.

La amoxicilina, en medio alcalino, se descompone primero por abertura del anillo betalactámico, dando lugar al ácido peniciloíco, luego este ácido pierde CO_2 y forma el ácido penilóico.

En medio ácido, el ataque electrófilo sobre el N betalactámico y sobre el S tiazolidínico, hace que la amoxicilina se hidrolize dando lugar al ácido penicilénico, que presenta una banda de absorción aproximadamente a 320 nm que al no ser estable, se convierte rápidamente en los correspondientes ácidos penilóico y peniciloíco (81). Esta hidrólisis, ha sido la base para la determinación de ampicilina (82) y amoxicilina (83). Ni el ácido 6-aminopenicilánico ni el ácido peniciloíco forman el ácido penicilénico. El pH influye mucho en la estabilidad por tratarse de reacciones de hidrólisis (ver cuadro nº 9).

- Degradación enzimática:

Las beta-lactamasas están producidas por estafilococos y bacterias Gram + y Gram -.

Las beta-lactamasas, como otras enzimas, son protefnas macromoleculares y aunque la acción de todas ellas es análoga, su composición y propiedades físico-químicas son diversas.

Las beta-lactamasas producidas por organismos Gram + son "extracelulares". Se liberan normalmente en el medio de cultivo, mientras que las producidas por los Gram - son "endocelulares" y sólo se liberan por destrucción de la membrana celular.

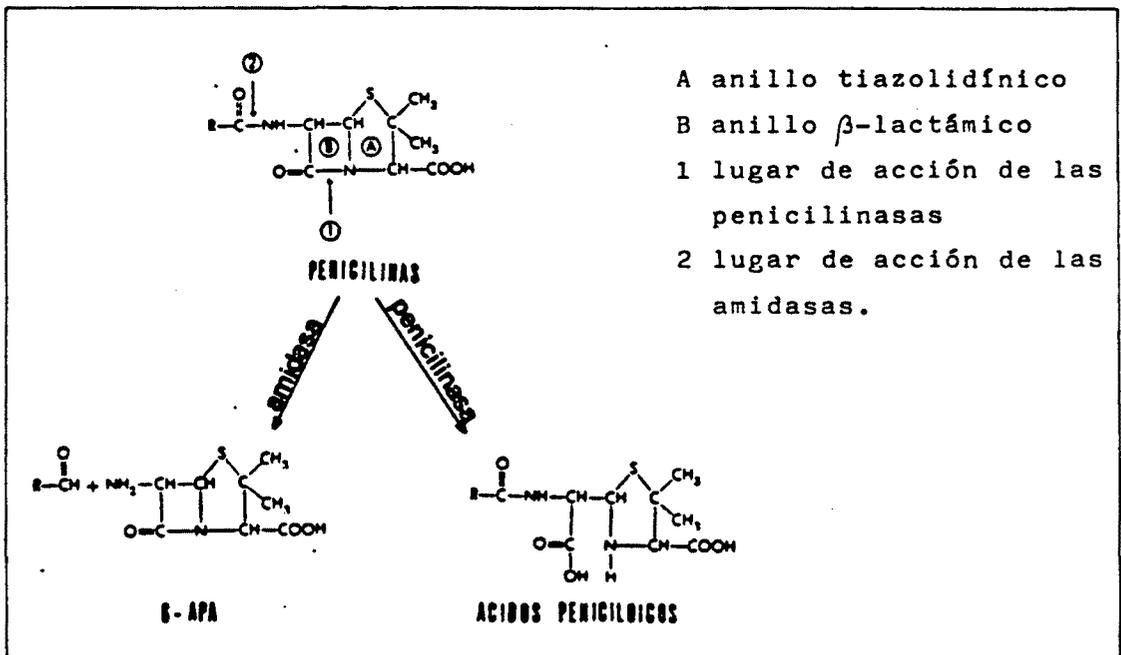
Todas ellas provocan la rotura de enlace beta-lactámico por hidrólisis (78) dando ácido peniciloico e inactivando la penicilina.

Las amidasas o acilasas producidas por organismos Gram- catalizan la hidrólisis del grupo amida de la cadena lateral produciendo ácido 6-aminopenicilánico disminuyendo extraordinariamente la actividad aunque no desaparezca totalmente (84).

En el cuadro nº 10 se esquematiza la estructura de la penicilina y los productos obtenidos por la hidrólisis enzimática.

- Polimerización:

La amoxicilina, como todas las penicilinas aminadas, forma fácilmente polímeros por condensación de dos o más moléculas (oligómeros) de amoxicilina en solución acuosa. De modo que el grupo amino primario de la cadena lateral de una molécula reacciona con el anillo betalactámico de otra, dando lugar a una cadena de moléculas en las que sólo queda intacto el último anillo betalactámico. Recientemente, se ha demostrado el carácter antigénico de estos polímeros. Este apartado se comentará más ampliamente en el capítulo correspondiente a productos de degradación (138).



Cuadrón^o 10 : Degradación enzimática de penicilinas.

10.4 Valoración:

Actualmente, la potencia de las penicilinas semisintéticas se expresan en unidades de peso, y se comparan con las "sustancias químicas de referencia" que proporciona la OMS. (85)

Los métodos de valoración pueden resumirse de dos grandes grupos:

- métodos biológicos
- " químicos y fisicoquímicos

Entre los biológicos, los mas empleados son el difusión en agar y el de dilución o turbidimétrico. Entre los químicos se usan los generales de las penicilinas, tales como:

- yodotimétrico
- hidrólisis alcalina
- colorimétricos
- espectrofotométricos

Recientemente, se han descrito dos métodos para la valoración de penicilinas y cefalosporinas, empleando NBS (N-bromosuccinimida) y NBDMO (3 bromo 4,4 dimetil 2 oxazolidinona) (86, 87)

Para la valoración específica de amoxicilina se han descrito métodos fluorimétricos (88, 89), polarográficos (90,91) y varios métodos cromatográficos por HPLC y CCF, los cuales se comentarán en la parte experimental.

10.5 Farmacología y farmacocinética:

La amoxicilina es estable en medio ácido y se absorbe muy bien por vía oral. Los estudios de absorción y excreción de amoxicilina en el hombre hechos por Croydon & Sutherland (92) y Neu & Winshell (93) dan como resultados los valores del cuadro nº 11. Los niveles séricos de amoxicilinas tras administración por vía oral son aproximadamente el doble de los obtenidos con ampicilina.

Acred y col., (94) demostraron en los estudios iniciales de amoxicilina, que la amoxicilina trihidrato resultaba también más activa que la sal sódica de ampicilina, administrada por vía parenteral a monos, perros, ratas y ratones en la protección de la infección experimental. Posteriormente Hunter y col., (95) comprobaron que estas diferencias eran debidas a la mayor actividad "in vivo" de la amoxicilina. Komber y col., (96) confirmaron que la amoxicilina sódica es más efectiva que la ampicilina sódica en el tratamiento por vía parenteral de la infección experimental en ratón, probablemente por su mayor actividad bactericida y por las características de su mayor distribución y su baja ligazón a proteínas. (93)

A nivel de estudio celular, Nakazawa (97) ha demostrado que la actividad bactericida frente a *Escherichia Coli* de amoxicilina se ejerce en un tiempo inferior que con ampicilina y con mayor potencia aunque la C.M.I. es la misma para los dos antibióticos.

Existen pues diferencias de mecanismo antibacteriano entre la ampicilina y amoxicilina que justifican la sustitución de

aquel antibiótico por amoxicilina tanto en la vía oral (mejor absorción) como vía parenteral (mayor actividad y mejores niveles).

- Efecto de los alimentos:

Los resultados dados en el cuadro nº 12 muestran las concentraciones medias del fármaco en suero, obtenidas en estudios cruzados realizados con voluntarios, tras administrar dosis de 250 y 375 mgr , de amoxicilina en ayunas y después de ingerir alimentos. De donde podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Se excreta por orina más amoxicilina (60 %) que ampícilina (40 %).
- La absorción por el tracto gastrointestinal está menos influenciada por la ingestión de alimentos que la ampícilina. La amoxicilina da concentraciones más altas en sangre, incluso cuando se administra después de las comidas.
- La amoxicilina no se metaboliza "in vivo" en ninguna otra sustancia con actividad antibacteriana que se excrete por orina.
- De una dosis de 250 mg de amoxicilina administrada por vía oral sólo se transforma un 20 % en ácido peniciloíco inactivo, que aparece en orina de forma similar a como lo hace el de la ampícilina (98).

Dosis (mg)	Nº de personas	Concentración media en suero (mcg.(ml))						Excreción en orina 0-6 hs. (% de dosis)
		0'5 hs.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.		
125	22	0'45 (0'5)*	1'46 (1'0)	2'62 (0'94)	0'57 (0'27)	0'15 (0'07)	54 (13)	
250	22	1'73 (1'48)	4'00 (2'12)	5'31 (1'09)	0'98 (0'39)	0'30 (0'11)	62 (21)	
375	11	2'00 (1'53)	4'41 (2'00)	7'10 (1'71)	1'60 (0'48)	0'44 (0'13)	67 (13)	
500	12	2'32 (2'09)	7'61 (3'09)	10'80 (2'92)	2'34 (0'84)	0'84 (0'30)	59 (15)	
625	11	2'91 (2'78)	9'53 (6'45)	11'40 (3'79)	3'90 (1'88)	1'22 (1'88)	55 (14)	
1.000	12	4'53 (3'9)	11'30 (6'3)	19'70 (5'4)	5'50 (1'5)	1'46 (0'46)	66 (16)	

* Desviación estandar

Cuadro nº 11- Absorción y excreción de amoxicilina después de la administración oral a personas en ayunas.

- Efecto de la probenecida:

La administración de la probenecida provoca un aumento de las concentraciones medias de amoxicilina en suero, siendo la diferencia más importante a las 2,4 y 6 horas, tal como vemos en el cuadro nº 13.

Ocasiona también, una reducción de la cantidad de principio activo excretado por orina durante el período de 6 horas que sigue a la administración.

Esta es una asociación empleada en el tratamiento de la meningitis (99, 100, 101).

- Efecto del ácido clavulánico:

Como hemos dicho anteriormente, la amoxicilina es inestable frente a betalactamasas estafilocócicas y a muchas de las de bacilos Gram-. Su combinación con el ácido clavulánico potente estafilocócico y efectivo frente a betalactamasas plásmido-dependientes de bacterias Gram-, aumenta su eficacia, aunque no posea una acción significativa sobre su absorción, distribución y excreción. La asociación se administra a unas dosis de 500 mgr , de amoxicilina y 125 mgr de ácido clavulánico (102).

Esta asociación se emplea en infecciones del tracto urinario.

- Comparación con la ampicilina:

Las concentraciones séricas medias obtenidas de estudios cruzados para comparar la absorción y excreción de amoxicilina y ampicilina después de la administración de una dosis de 500 y 250 mg a personas en ayunas aparecen en las gráficas núms. 11 y 12.

Las células microbianas se hinchan y lisan con rapidez en presencia de amoxicilina, y forman en cambio, filamentos largos y esferoblastos antes de la bacteriolisis, cuando están en presencia de ampicilina.

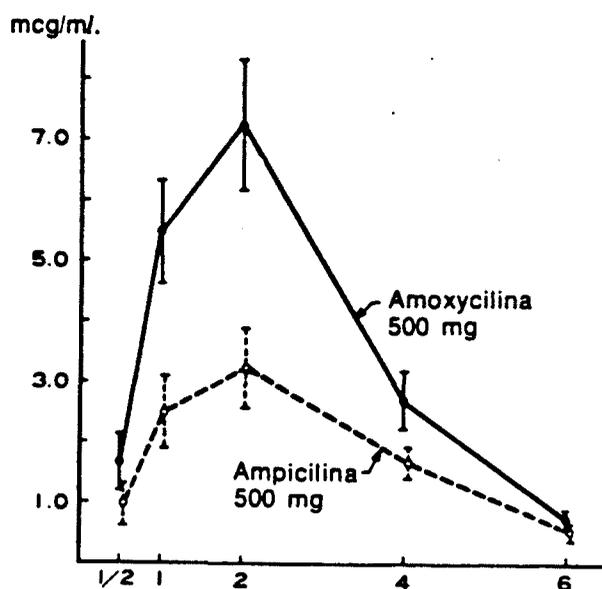
La amoxicilina es ligeramente más activa que la ampicilina frente algunos estreptococos y salmonellas, pero menos activa frente a *Shigella* spp. (99).

Dosis (mg)	Estado	Concentración media en suero (mcg/ml.)					Excreción en orina 0-6 (% de dosis)
		0,5h.	1h.	2h.	4h.	6h.	
250	Sin ayu nar	1,2	4,3	4,7	1,6	0,5	70
	Ayunan- do	2,0	4,8	5,2	1,1	0,4	56
375	S.ayunar	2,5	5,9	5,9	2,5	0,8	53
	Ayunando	2,1	5,5	7,3	1,6	0,5	53

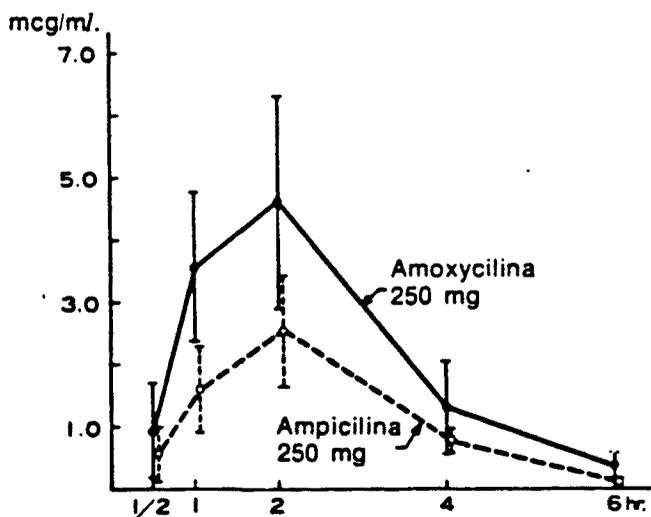
Cuadro nº 12. Efecto de los alimentos en la absorción y excreción de la amoxicilina en humanos. (Se hizo la prueba con 12 personas por dosis):

Dosis (mg).	Nº de pers.	Régimen	Concentración media en suero (mcg/ml).					Excreción en orina 0-6 hs (%dosis)
			0,5h.	1h.	2h.	4h.	6h.	
250	11	Con proben	1,8	4,7	7,7	3,1	1,1	54
	12	Sin proben	1,5	3,8	5,1	1,0	0,3	67
375	11	Con proben.	2,8	7,3	11,8	4,7	1,5	53
	11	Sin proben.	2,0	4,4	7,1	1,6	0,4	67

Cuadro nº 13. Efecto de la probenecida en la absorción y excreción de amoxicilina en personas en ayunas.

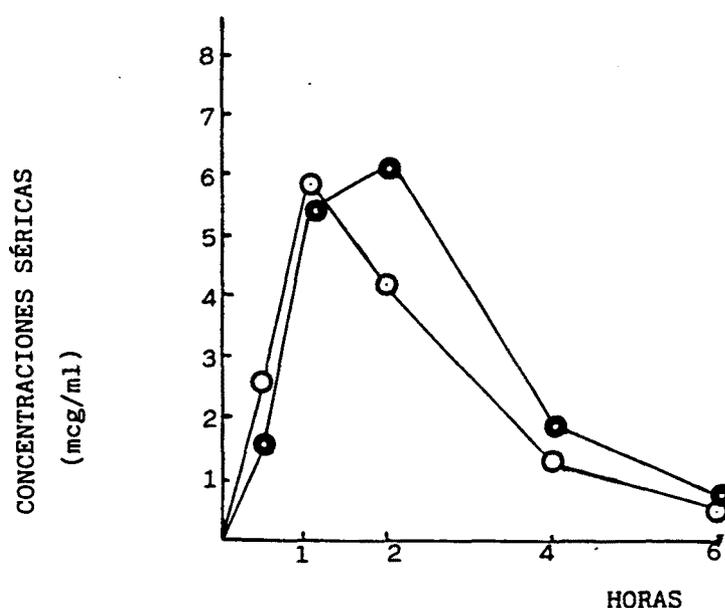


Gráfica nº 11.- Niveles séricos de Amoxicilina y Ampicilina administradas oralmente en una experiencia cruzada en dosis de 250 mg a voluntarios sanos en ayunas.



Gráfica nº 12.- Niveles séricos de Amoxicilina y Ampicilina administradas oralmente en una experiencia cruzada en dosis de 500 mg a voluntarios sanos en ayunas.

- Comparación con la pivampicilina: Estudios de comparación ente los niveles séricos de amoxicilina y pivampicilina dan la gráfica n°13.



Gráfica n° 13.-Concentración de fármaco en el suero de 15 personas en ayunas después de una dosis única de 358 mgr de amoxicilina y pivampicilina.

En el transcurso de la primera hora posterior a la administración de dosis comparables de pivampicilina y amoxicilina los niveles séricos son semejantes. Una vez pasada la primera hora, los niveles séricos de pivampicilina disminuyen bastante, mientras que los de amoxicilina continúan subiendo, hasta alcanzar un máximo a las dos horas. Por último, en el período entre 2-6 horas los niveles de amoxicilina son considerablemente mayores que los de amoxicilina obtenidos por la administración de la pivampicilina (103).

10.6 Acción terapéutica (104):

El valor terapéutico de un antibiótico depende de la amplitud de su aspecto antibacteriano y de su estabilidad frente a las betalactamasas bacterianas. Su eficiencia se expresa por el cociente V_{\max}/K_m , frente a una concentración enzimática constante en el conjunto del antibiograma.

Los betalactámicos impiden el establecimiento de los enlaces transversales peptídicos necesarios para la consolidación del peptidoglucano. En efecto, las Penicilinas, son análogos estructurales de la D-alanil-D-alanina presente en el extremo de las cadenas peptídicas de las unidades de Muro péptido, que se fijan a la transacilasa, responsable de la transpeptidación (105)(Fig. 13).

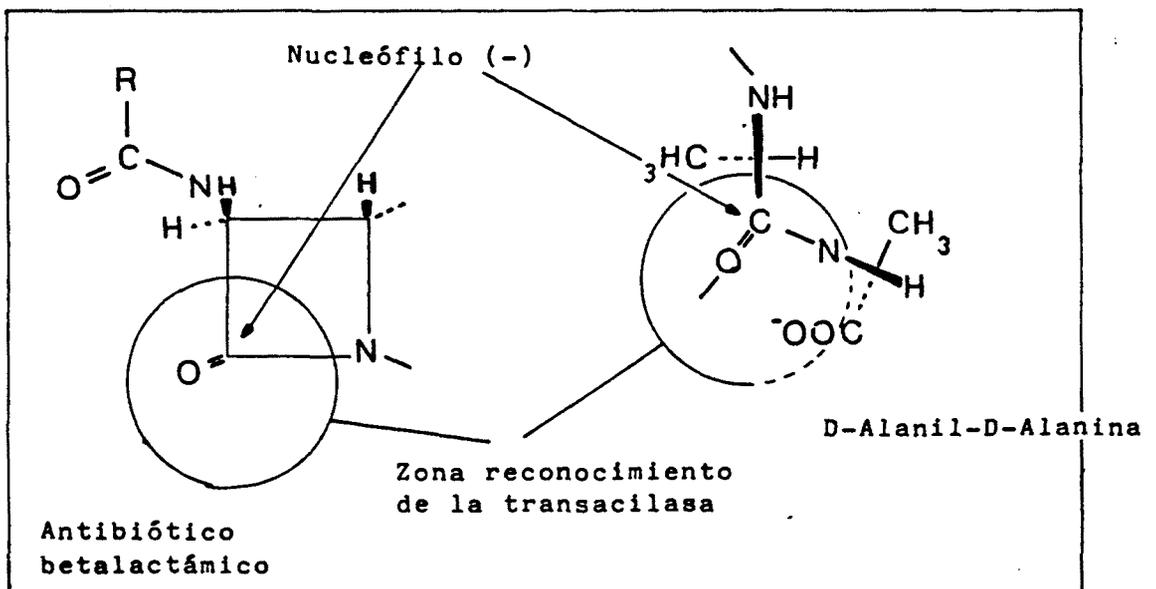


Figura n° 13.

La amoxicilina, concretamente se emplea en el tratamiento de infecciones del tracto genito-urinario por E. Coli, Pr. mirabilis o Str. faecalis, N. gonorrhoeae, infecciones del tracto respiratorio por H. influenzae, como alternativa al cloranfenicol en las fiebres tifoideas, en infecciones por Salmonella spp. en infecciones de la piel por E. coli y en la leptospirosis (103, 106).

- Resistencia: Los géneros Kebsiella, Enterobacter, Serratia y Pseudomonas son resistentes a la amoxicilina (93). Se ha determinado un mecanismo de resistencia cruzada entre la amoxicilina y la ampicilina.

- Toxicidad: Como penicilina posee la toxicidad y efectos secundarios de todas ellas (reacciones cutáneas, etc). En el caso de la amoxicilina sódica, estos fenómenos alérgicos se ven incrementados por su tendencia a polimerizarse en solución acuosa (107), todo ello será comentado con mayor amplitud en el capítulo correspondiente a productos de degradación.

PARTE EXPERIMENTAL:

Objetivo:

Nuestro trabajo experimental se ha orientado fundamentalmente a encontrar la metódica idónea para obtener la amoxicilina sódica soluble lo más pura posible, en función de la calidad química obtenida y la estabilidad del producto conseguido.

Como todo estudio de estabilidad, ello nos obliga a la utilización de técnicas analíticas que permitan la identificación del p.a. así como de los productos de degradación.

Las técnicas analíticas empleadas han sido:

- CLAR (Cromatografía líquida de alta resolución).
- Espectrofotometría.
- Cromatografía de fases para determinar disolvente residual.
- Iodimetría para determinación de productos de degradación.
- Determinación de puntos eutécticos por ATD.
- Espectroscopia infrarroja.

La sistemática seguida en este estudio se fundamenta en los aspectos siguientes:

1. Validación de los métodos analíticos aplicados a amoxicilina.
2. Análisis cuali y cuantitativo de la amoxicilina trihidrato.
3. Aportación a la obtención de amoxicilina sódica por liofilización en medio acuoso y en medio acuoso-orgánico.
4. Obtención de amoxicilina sódica por precipitación.
5. Estudio de estabilidad acelerada a tres temperaturas y estabilidad a temperatura ambiente.
6. Tratamiento matemático de los resultados obtenidos por aplicación de la ecuación de Arrhenius, a través de un sistema informático (GETRONICS).
7. Identificación de los productos de degradación de la amoxicilina sódica por CLAR y CCF.

8. Síntesis de productos de degradación de amoxicilina sódica.
9. Caracterización de los productos de degradación de amoxicililina sódica.
10. Prospección cualitativa de diferentes amoxicilinas sódicas del mercado.

11. Material utilizado:

- Espectrofotómetro Beckman Mod. 25 con registrador.
- Espectrofotómetro IR Perkin-Elmer Mod. 1430.
- Espectropolarímetro Perkin-Elmer Mod. 204.
- Cromatógrafo WATERS: Detector M-440, Bomba M-45, Inyector U6K, Data Module M-730.
- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Sigma 3B/H56. Control ionización a la llama con registrador Hitachi Mod. S61. (Técnica HEAD-SPACE).
- RMN Perkin-Elmer Mod. Variant XL 200.
- Potenciómetro Radiometer pHmeter 28.
- Liofilizador TELSTAR Liolabor tipo L-3.
- Caja isotérmica USIFROID, con el equipo necesario para la práctica del ATD y registrador LUXYTRACE $Y=f(x)$, tipo TR-VAT mod. 477.

Además de los aparatos mencionados, hay que añadir los materiales de uso corriente en el laboratorio. Los reactivos y disolventes empleados con calidad análisis y CLAR, respectivamente.

12. Análisis de la materia prima utilizada:

La amoxicilina trihidrato empleada es de calidad farmacéutica USPXXI-BP80 (LIESSA).

- Punto de fusión: No se ha encontrado descrito en la bibliografía. En nuestro estudio se ha determinado por el método del tubo capilar con el aparato Büchi, y hemos observado que alrededor de 206°C se descompone.
- Acidez: Una disolución de 0,2 g de amoxicilina trihidrato en 100 ml de agua nos da un valor de pH igual a 4,2 estando dentro de los límites que indica la Farmacopea Británica 1.980 (108).
- Humedad: La B.P.80 (108) indica que la humedad del trihidrato de amoxicilina debe estar comprendida entre el 11,5 y el 14%. Hemos hallado la humedad por el método del Karl-Fischer, dándonos un valor del 12,74%.
- Poder rotatorio: La B.P. (109) establece entre +290° y 310° el poder rotatorio específico del trihidrato de amoxicilina, a una concentración del 0,2% p/v en agua. Nosotros hemos obtenido un poder rotatorio $\left[\alpha_D^{20} \right] = 301^\circ$, que se halla dentro de límites.
- Espectro UV: Hemos realizado el espectro UV de la amoxicilina trihidrato en diferentes medios. Gráficas nº 4,5,6,7 y 8.
- Espectro IR: Hemos obtenido un espectro de la amoxicilina trihidrato en pastilla de KBr, gráfica nº 54, que coincide totalmente en el referido en la pag. nº 289.
- Cromatografía en capa fina: La realización de la cromatografía en capa fina la hemos hecho siguiendo diversas técnicas,

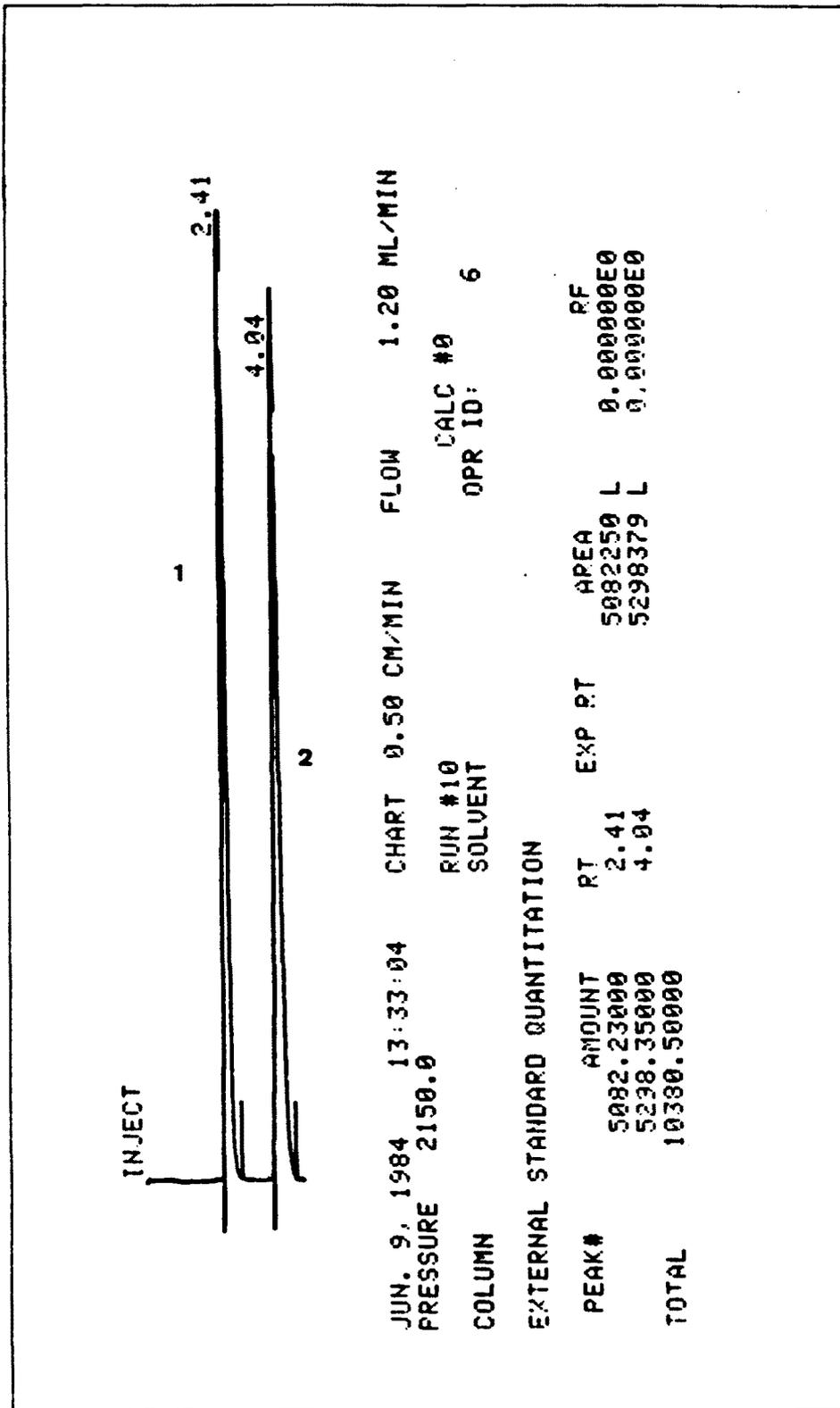
como veremos más adelante, siendo el método de la B.P. (110) el que mejores resultados nos ha proporcionado.

Para ello se ha utilizado placas Merck DC-Fertigplatten Kieselgel 60 de 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor.

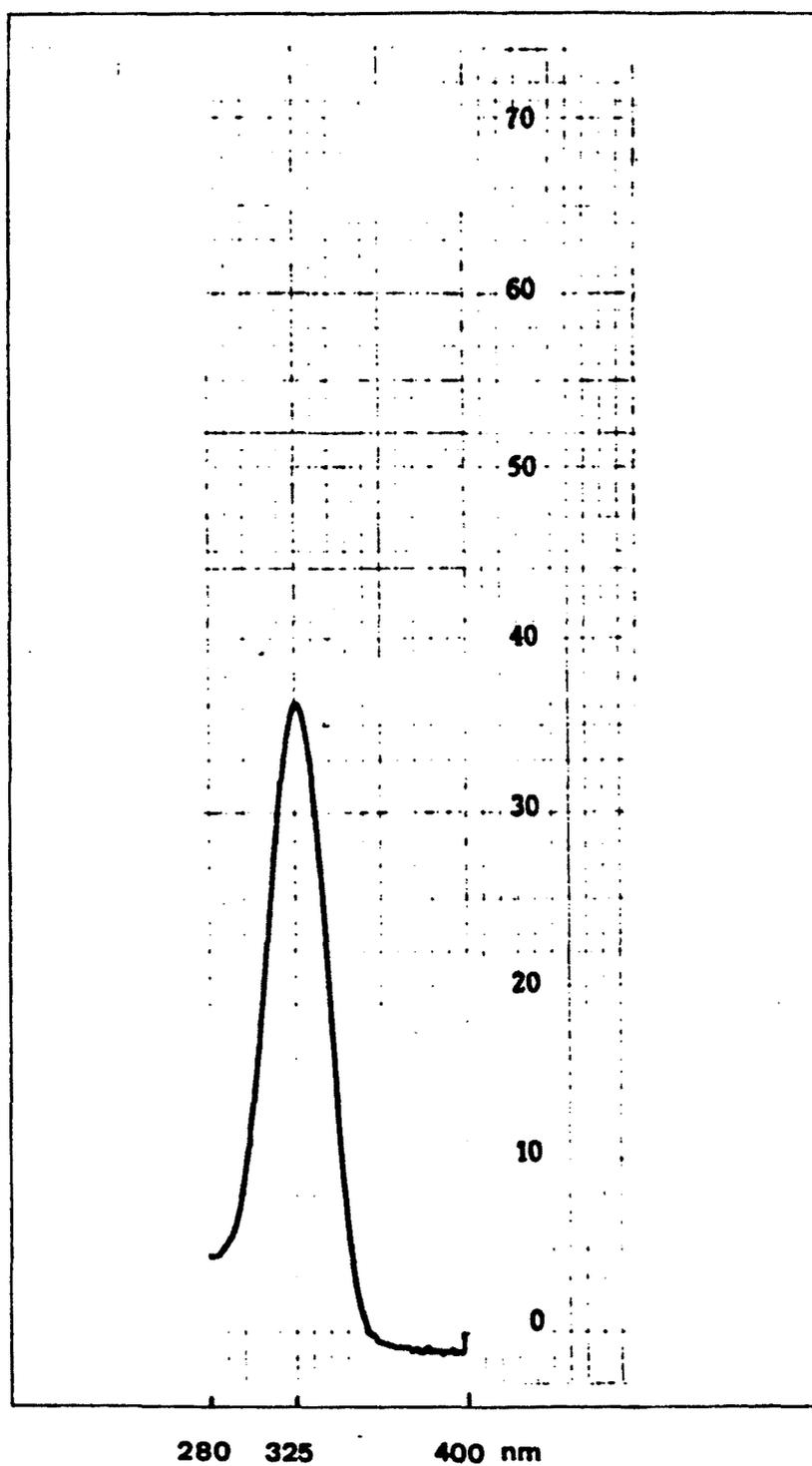
Hemos analizado la amoxicilina trihidrato LIESSA que se ha utilizado, por CLAR y espectrofotometría, mediante los métodos analíticos que se han empleado durante el estudio experimental y que se describen los capítulos correspondientes. Los resultados se hallan en el cuadro nº 14 . Gráficas nº 14 y 15.

Método Analítico	Amoxicilina trihidrato p.s. en %
Espectrofotometría	98,40
CLAR	98,84

Cuadro nº 14.



Gráfica nº 14.



Gráfica nº 15.

13. Evaluación de métodos cuantitativos de amoxicilina mediante CLAR:

Los programas de control de calidad de los medicamentos requieren que los métodos analíticos sean exactos, específicos y que ahorren tiempo. Debido a la ausencia de especificidad de los métodos oficiales de valoración de amoxicilina, se han propuesto recientemente varios métodos de CLAR en fase reversa para la determinación de amoxicilina trihidrato, sódica, productos de degradación, polímeros y en sus formas farmacéuticas (107, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118). Los métodos por CLAR además de no requerir el calentamiento ni la destrucción de la amoxicilina, tienen la ventaja de que nos permiten identificar y cuantificar sus productos de degradación.

A pesar de que en la bibliografía se emplean métodos de elevada sofisticación (doble bomba, flujos variables, proporciones variables de eluyente, diferentes longitudes de onda, termostatación de columna, precolumna), en el presente estudio experimental se ha puesto a punto un método notablemente más sofisticado utilizando un sistema monobomba, longitud de onda fija y flujo isocrático, que produce en el peor de los casos, resultados equivalentes a los encontrados en la bibliografía.

13.1 Método CLAR utilizado:

Equipo: Detector WATERS M-440
Bomba WATERS M-45
Inyector WATERS U6K
Data Module WATERS M-730

Columna: μ Bondapack C₁₈ de fase reversa, de 30 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno (I.D.). Tamaño de partícula 10 μ m.

Eluyente: Metanol: 0,02 M fosfato dibásico monopotásico, (85:15 V/V).

Longitud de onda: 254 nm.

Temperatura de columna: Temperatura ambiente.

Flujo: 1,2 ml/min isocrático.

Velocidad de papel: 0,5 cm/min.

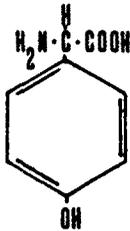
Para la preparación de la solución reguladora, se pesan 2,7218 g de fosfato dibásico monopotásico y se disuelven en 1 litro de agua calidad CLAR en matraz aforado, ajustando el pH de la solución a 4,0 - 4,5 con NaOH 10 N o H₃PO₄ 18 N.

Una vez preparado el eluyente, se desgasifica por ultrasonidos y se filtra mediante un filtro de membrana UTIPOR N₆₆ (Pall) de 47 mm de \varnothing y 0,45 μ m.

El pH de la solución reguladora se ajustó a los márgenes aludidos, a fin de conseguir una elución a un pH cercano al del punto isoeléctrico de la amoxicilina.

A este eluyente se llegó después de probar distintos disolventes orgánicos, como acetonitrilo, isopropanol y metanol, ver gráficas n^o 16, 17 y 18. Este último proporcionó una adecuada separación, en la proporción antes mencionada, ya que proporciones superiores de solución reguladora producían tiempos de retención elevados y peor separación (gráfica n^o 19).

Como estandar interno hemos utilizado la p-hidroxifenilglicina, de ahora en adelante cuando se tenga que nombrar, utilizaremos las siglas pOHg .

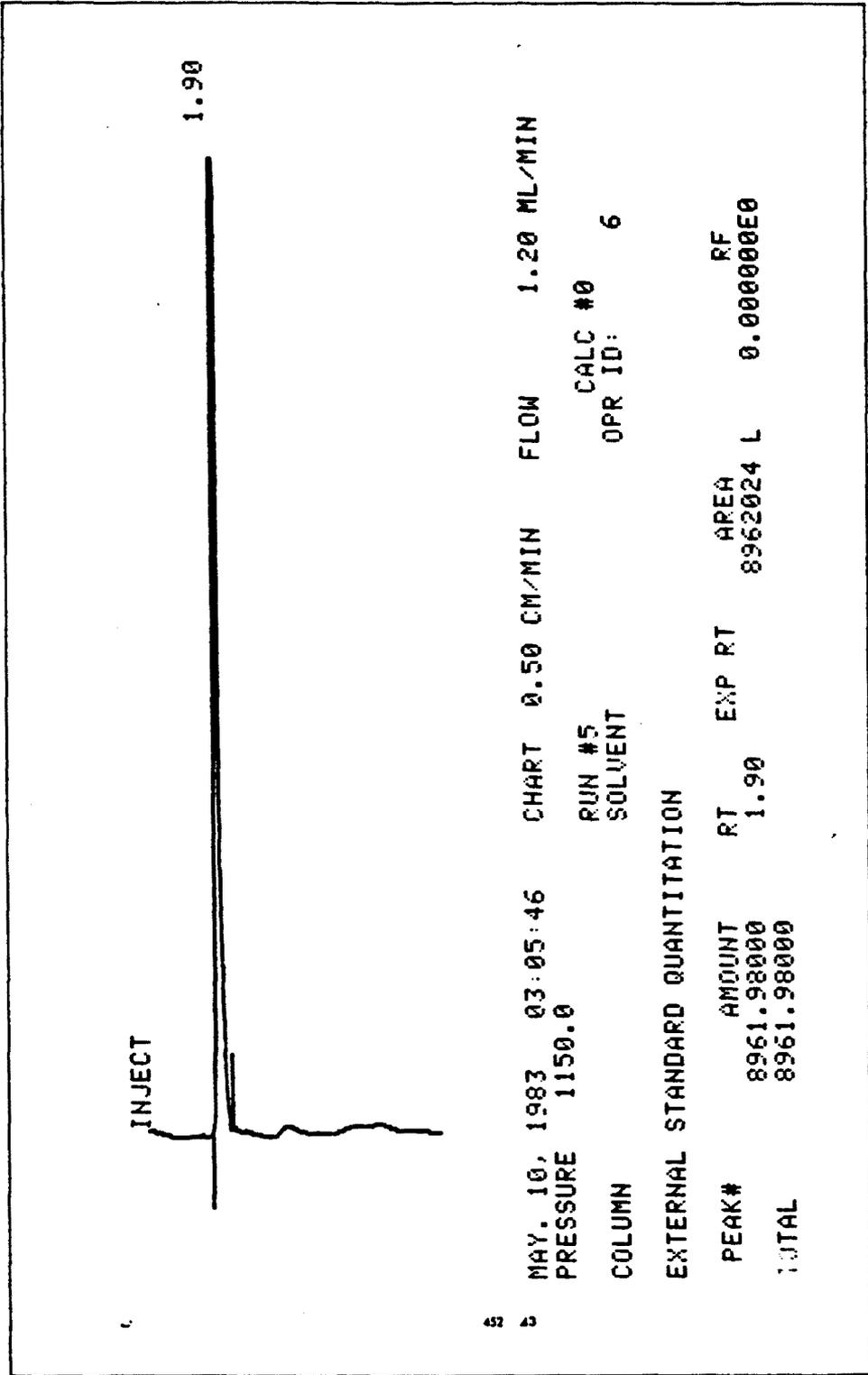


P. Mol. 167,16.

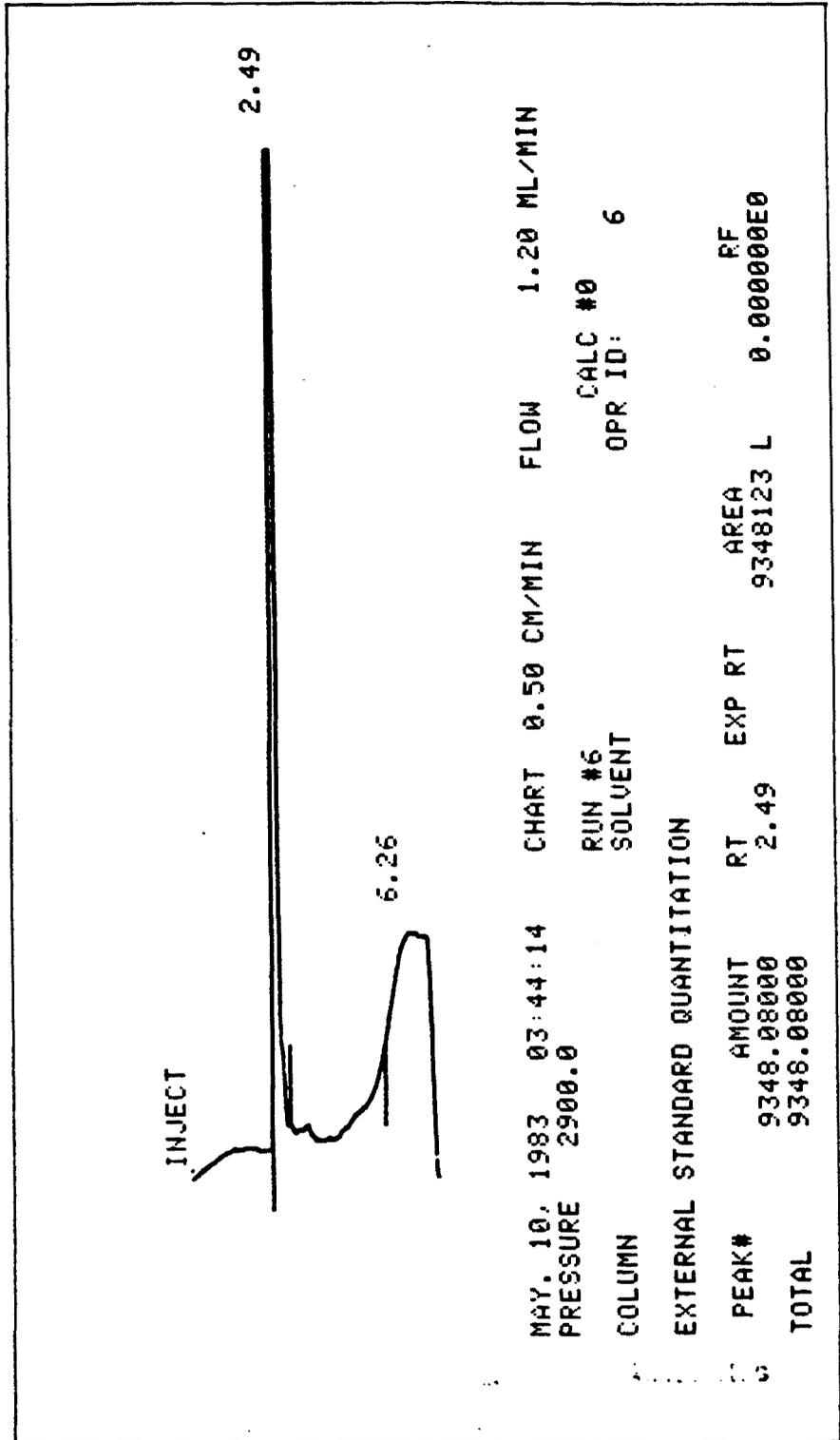
Los tiempos de retención de la amoxicilina y del estandar interno resultantes de la aplicación de este método CLAR, son respectivamente:

	Tiempo de retención (min)
Amoxicilina	4,0 ± 5 %
p-hidroxifenilglicina	2,4 ± 5 %

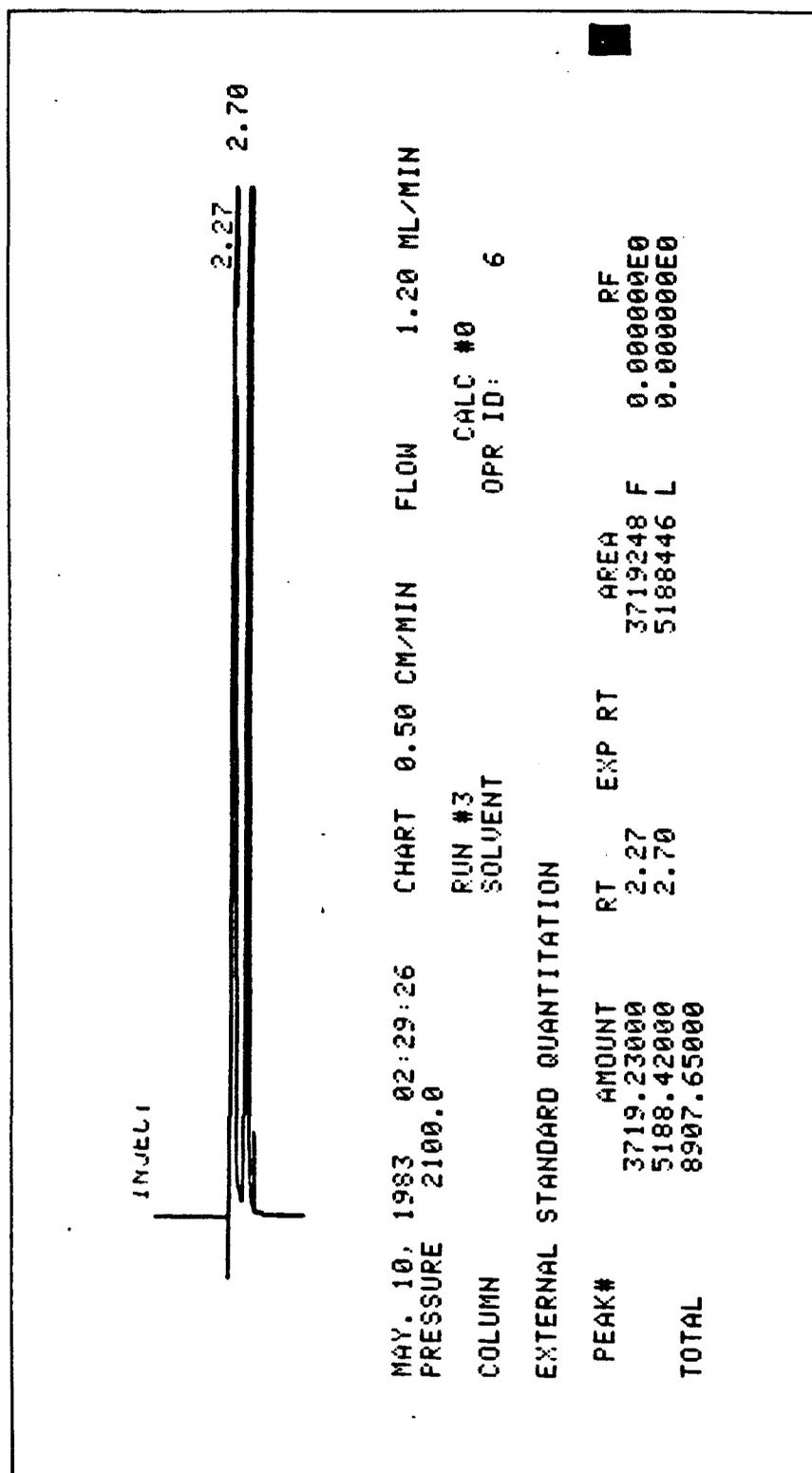
Como se observa en la gráfica nº 14 , primero (pico nº 1) eluye el standard y luego (pico nº 2) la amoxicilina. Mientras que el ácido amoxipeniciloico cuando se halla presente, eluye inmediatamente antes que la amoxicilina, como veremos más adelante.



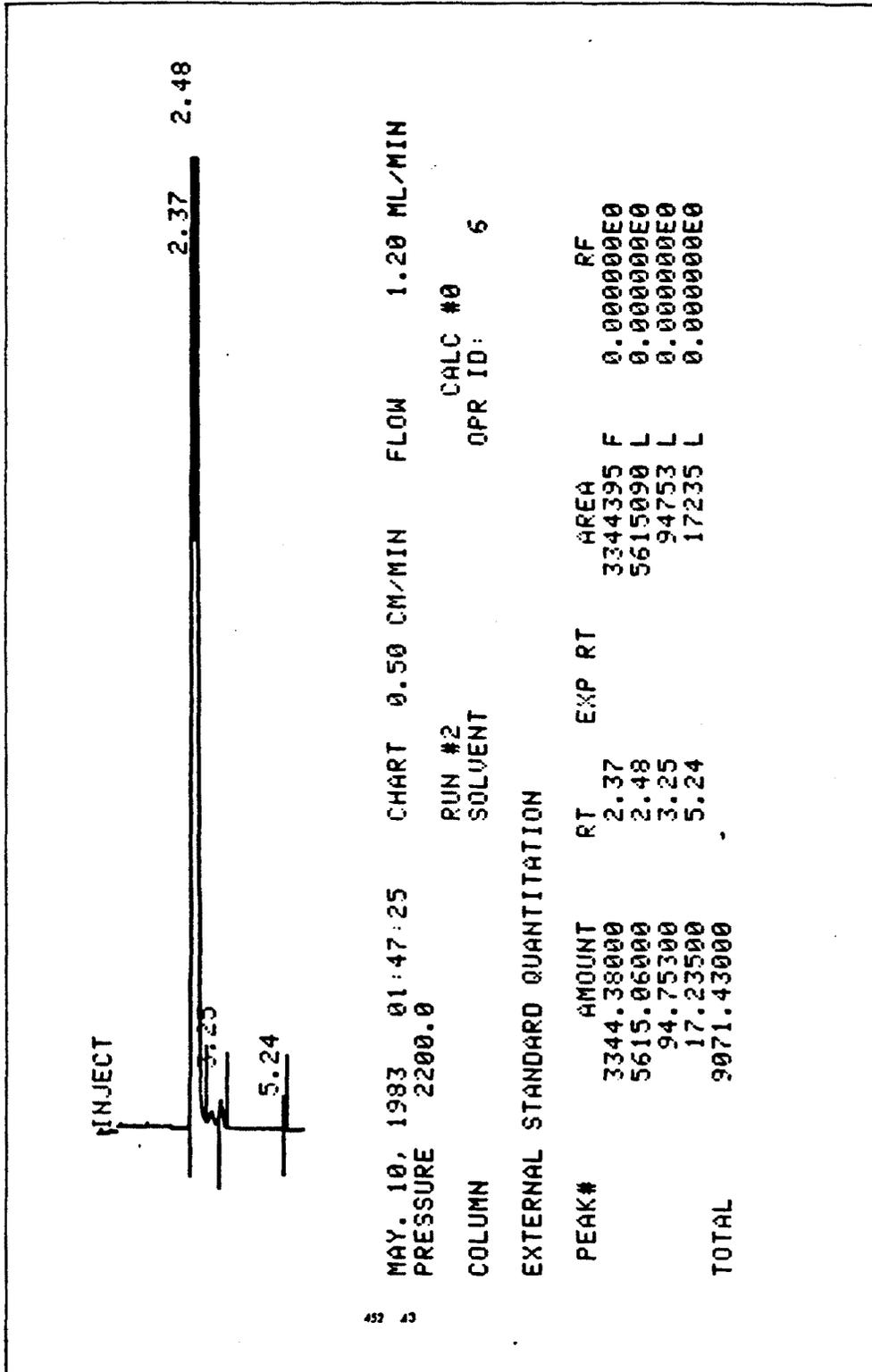
Gráfica nº 16 : Acetonitrilo + sol. reguladora.



Gráfica nº 17 : Isopropanol + sol. reguladora
 50:50 .



Gráfica nº 18 : Metanol + sol. reguladora. 70:30 .



Gráfica nº 19 : Metanol + sol. reguladora. 50:50 .

13.1.1 Validación método CLAR:

La técnica operativa que hemos empleado para determinar la linealidad del método es la siguiente:

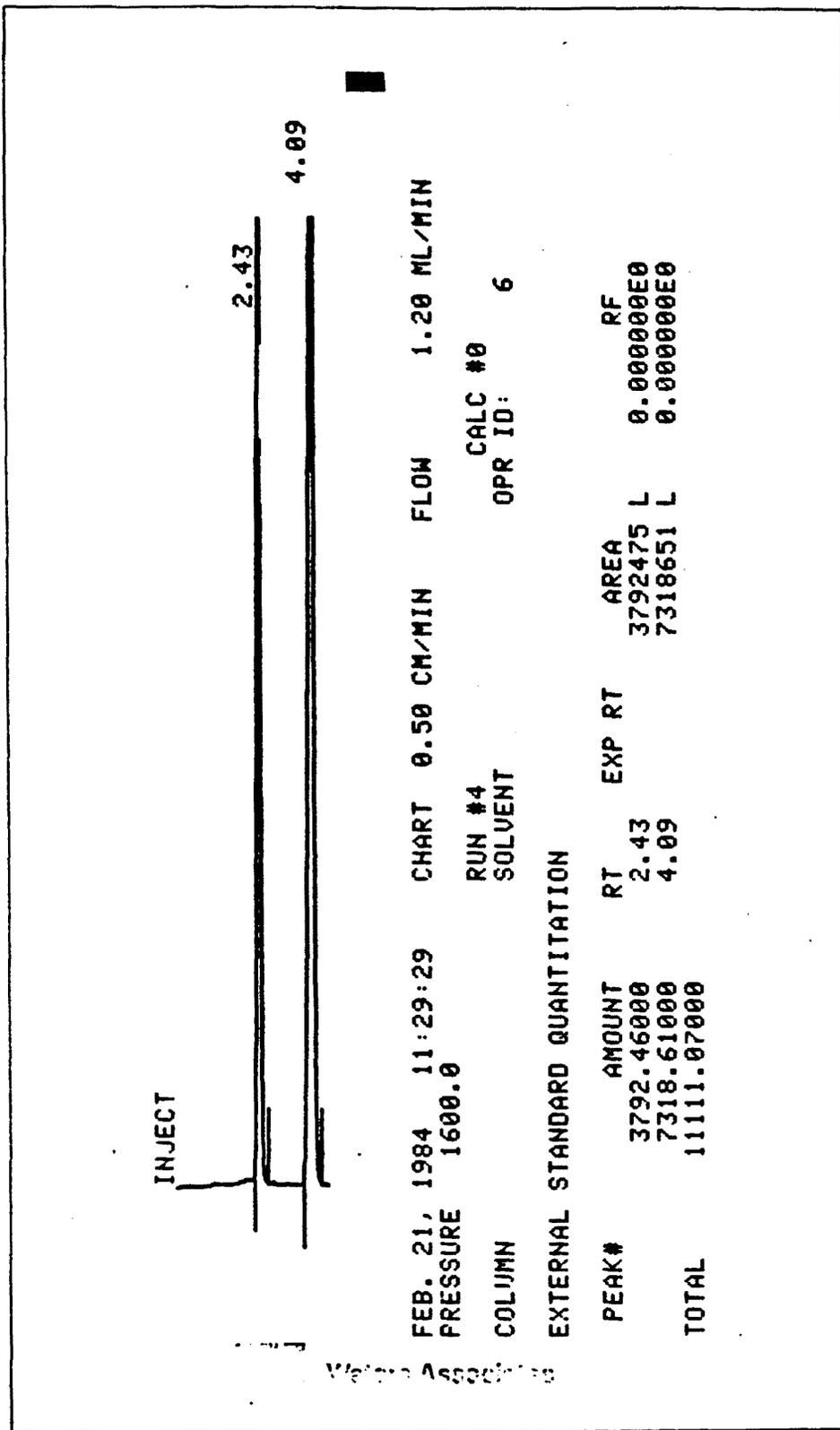
Se prepara una solución al 0,1% P/V de amoxicilina trihidrato Standard B.P., y una solución al 0,125 % p/v del standard interno p-hidroxifenilglicina con eluyente. De la solución de amoxicilina se toman 7, 6, 5, 4 y 3 ml y se colocan respectivamente en matraces aforados de 10 ml de capacidad, añadién dole a cada uno de ellos 3,0 ml de solución de standard inter no completando hasta 10 ml con eluyente. Las soluciones se homogenizan y filtrándose posteriormente mediante una jeringa provista de portafiltros Swinnex-13 con un filtro de membrana Millipore HAWP 01300 de 13 mm de \varnothing y 0,45 μ m.

Las soluciones así preparadas tienen una concentración de 0,7, 0,6, 0,5, 0,4 y 0,3 mg/ml de amoxicilina respectivamente y de 0,375 mg/ml. de standard interno cada una. De cada solución se inyectan 20 μ l, empleando una microjeringa Hamilton de 25 μ l, efectuándose 7 inyecciones consecutivas de cada muestra (gráficas n° 20,21,22,23 y 24), determinándose la relación de áreas entre:

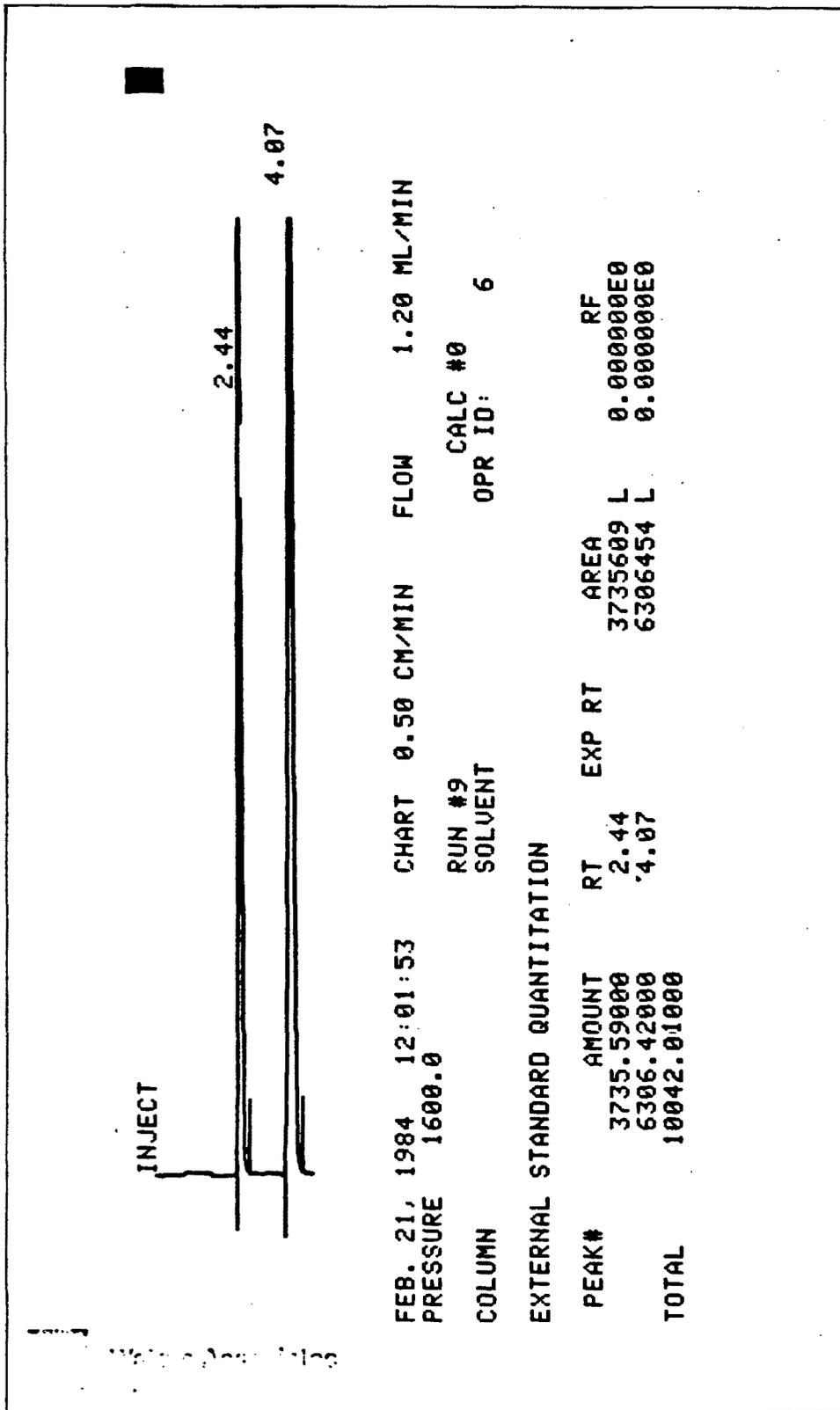
$$\frac{\text{Area de pOH g}}{\text{Area de Amoxicilina}}$$

de cada una de ellas. La recta de calibración se ha determina do utilizando

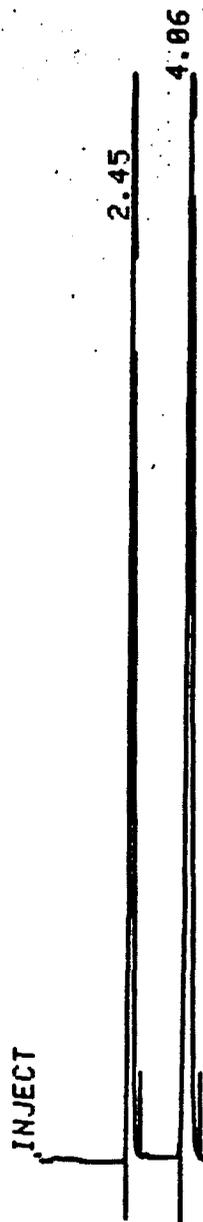
$$y = \frac{\text{Area de pOH g}}{\text{Area de Amoxicilina}}$$



Gráfica n° 20 .



Gráfica nº 21 .



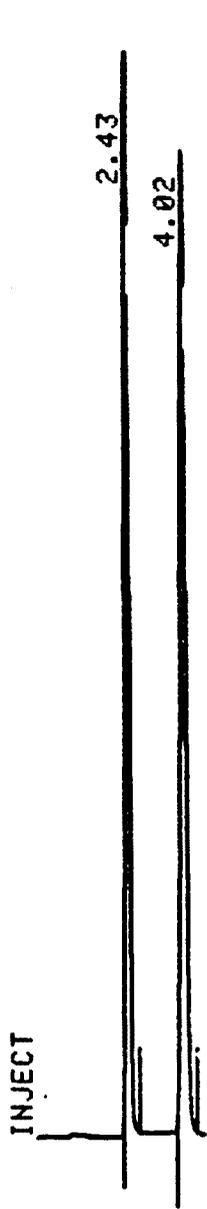
FEB. 21, 1984 13:03:01 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.20 ML/MIN
 PRESSURE 1600.0

COLUMN RUN #20 CALC #0
 SOLVENT OPR ID: 6

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	3675.67000	2.45		3675692 L	0.000000E0
	5257.28000	4.06		5257309 L	0.000000E0
TOTAL	8932.95000				

162

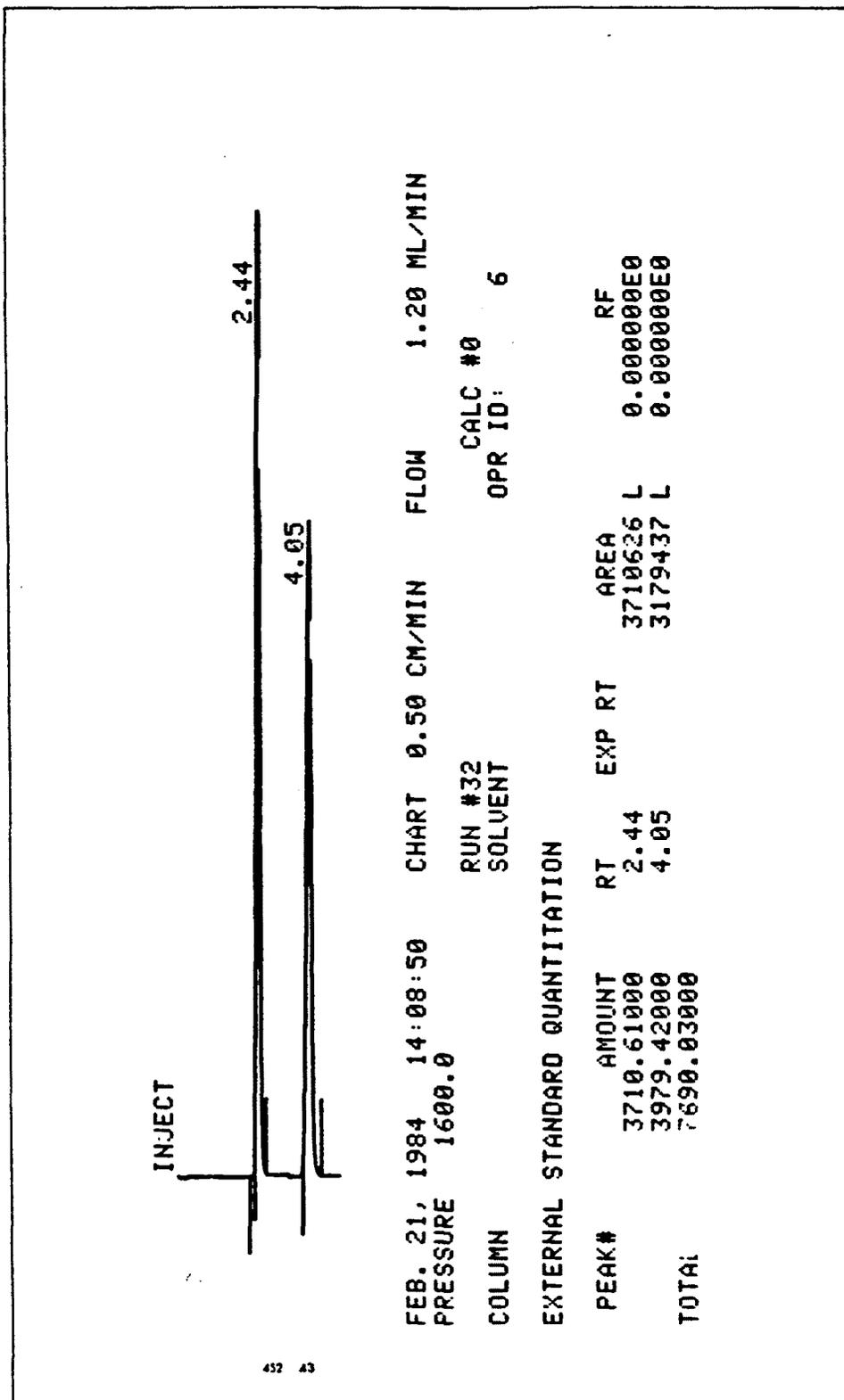


FEB. 21, 1984 13:46:30 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.20 ML/MIN
 PRESSURE 1600.0 RUN #28 CALC #0
 COLUMN SOLVENT OPR ID: 6

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	3690.95000	2.43		3690968 L	0.000000E0
	4521.98000	4.02		4222001 L	0.000000E0
TOTAL	8212.93000				

Gráfica nº 23 .



Gráfica nº 24 .

x = concentr. de la solución inyectada expresada en mg/ml.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro nº 15.

A fin de explorar la linealidad de estos datos hemos calculado el coeficiente de correlación, según la fórmula:

$$r = \frac{\Sigma x \cdot y - \frac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{N}}{\sqrt{\left[\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N} \right] \left[\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N} \right]}} = -0,994$$

Con los datos experimentales calculamos la desviación standard y el coeficiente de variación de cada grupo (ver cuadro), y por el método de los mínimos cuadrados, los parámetros de la recta de regresión definida por todos los datos disponibles resultando,

$$y' = b x + a$$

$$a = \frac{\Sigma x^2 \cdot \Sigma y - \Sigma x \cdot \Sigma xy}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = 1,2360$$

$$b = \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} = -52,54$$

La desviación tipo residual no explicable por la regresión,

$$s = 1,62 \cdot 10^{-2}$$

Concent. en mg/ml	0,014	0,012	0,01	0,008	0,006
Relación de áreas pOH g / Amox.	0,5170	0,5918	0,6990	0,8161	0,9323
	0,5265	0,5922	0,6987	0,8203	0,9274
	0,5185	0,5978	0,6911	0,8153	0,9399
	0,5181	0,6037	0,6837	0,8147	0,9105
	0,5195	0,5997	0,6824	0,8100	0,9388
	0,5146	0,5866	0,6877	0,8115	0,9432
	0,5221	0,5906	0,6859	0,8132	0,9327
	\bar{X}	0,5194	0,5946	0,6904	0,8144
$\sigma_n - 1$	$3.8508 \cdot 10^{-3}$	$5.9533 \cdot 10^{-3}$	$6.796 \cdot 10^{-3}$	$3.3614 \cdot 10^{-3}$	$5.7194 \cdot 10^{-3}$
c.v.	0,6864	0,9269	0,9525	0,3821	0,5663

Cuadro n° 15 .

La desviación tipo de a,

$$s_a = 1,01 \cdot 10^{-2}$$

La desviación tipo de b,

$$s_b = 9,68 \cdot 10^{-1}$$

Con estos datos podemos determinar el coeficiente de variación de a y de b, lo que nos dará idea de la precisión del método, según:

$$\frac{s_a}{a} \cdot 100 = 0,81$$

$$\frac{s_b}{b} \cdot 100 = 1,84$$

Para comprobar que el envejecimiento de la columna no afecta a la precisión del método, transcurridas unas 200 horas posteriores a la realización de la recta de calibrado, se realizó una serie de 10 inyecciones consecutivas de una solución de concentración igual a la concentración del punto medio de la recta de calibrado, caracterizando la muestra estadísticamente. Resultados en cuadro nº 16 (gráficas nº 25 y 26).

Posteriormente se comparó mediante un test "F" la desviación tipo de la muestra (pag. posterior) y la desviación tipo con la que corresponde a la misma concentración de la recta de calibrado,

$$F = \frac{(6,796 \cdot 10^{-3})^2}{(5,311 \cdot 10^{-3})^2} = 1,64$$

Relación Areas		
<u>pOHg</u> Amoxi	0,7052	0,7100
	0,7065	0,7113
	0,7159	0,7098
	0,7191	0,7007
	0,7125	0,7074
\bar{x}	0,70984	
σ_n	$5,311 \times 10^{-3}$	
N	10	

Cuadro n° 16 .

Este valor no es pues significativo, combinando las variancias,

$$s^2 = \frac{s_1^2 (N_1 - 1) + s_2^2 (N_2 - 1)}{(N_1 - 1) + (N_2 - 2)}$$

$$s = 5,95 \cdot 10^{-3}$$

y con esta desviación tipo combinada se puede realizar un test "t" entre las dos muestras, de donde,

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{comb} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

$$t = 6,63$$

La diferencia de las muestras es altamente significativa, no así el valor "F", eso demuestra que si bien la sensibilidad de la columna con el tiempo disminuye, no ha afectado a la precisión del método analítico que se mantiene constante.

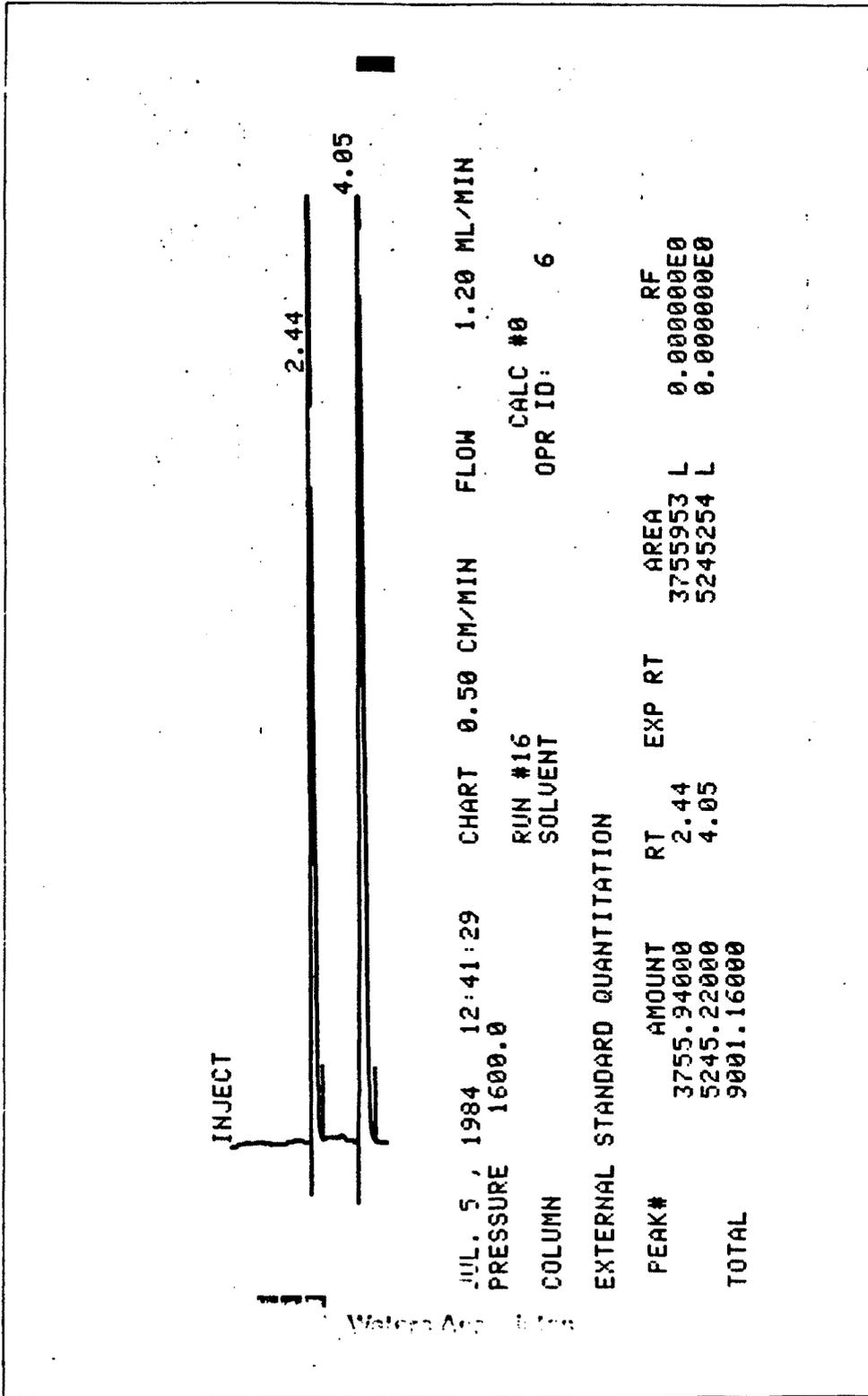
Para soslayar la pérdida de sensibilidad de la columna con el tiempo, todas las valoraciones, se realizan frente a solución patrón.

Cuando se valora un lote de amoxicilina sódica, la técnica operatoria es la siguiente:

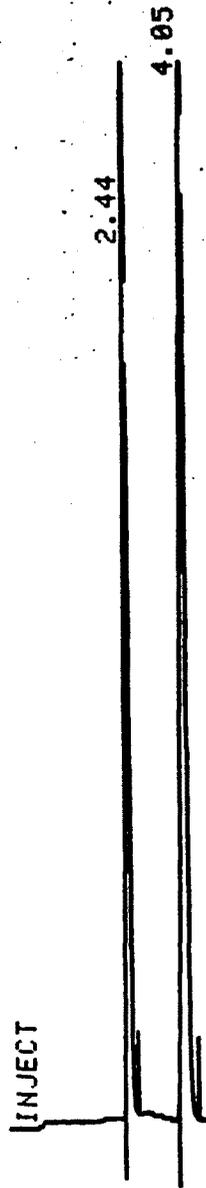
Se prepara una solución al 0,1% de amoxicilina trihidrato standard B.P., y una solución al 0,075% (concentración ajustada a la sensibilidad utilizada) de standard interno con eluyente. Se toman 5 ml de cada una de ellas, se homogeniza y filtra como se ha mencionado en la pag.138. Esta solución constituye la solución standard de referencia, de ella se inyectan 20 μ l, determinándose el factor (F) del cromatograma, calculándose éste, cuando la relación de áreas,

$$\frac{\text{Area pOH g}}{\text{Area Amoxicilina}}$$

de dos inyecciones consecutivas tenga una desviación porcentual inferior al 1%.



Gráfica nº 25 .



JUL 5 1984 12:36:05 CHART 0.50 CM/MIN FLOW 1.20 ML/MIN
 PRESSURE 1600.0 RUN #15 CALC #0
 COLUMN SOLVENT OPR ID: 6

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
	3744.71000	2.44		3744731 L	0.0000000E0
	5309.44000	4.05		5309465 L	0.0000000E0
TOTAL	9054.15000				

100

Inmediatamente se prepara la solución problema, de la misma forma que la de referencia pero con amoxicilina sódica a valorar, determinando la respuesta del cromatograma (R) y calculando su potencia como:

p- hidroxifenilglicina (p OH g)

$$\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \text{Potencia} \times \text{cantidad inyectada} = \mu\text{g p OH g}$$

Amoxicilina trihidrato standard

$$\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \text{Potencia} \times \text{cantidad inyectada} = \mu\text{g Amoxi St.}$$

Factor

$$\frac{\text{Area Amoxi St}}{\text{Area p OHg}} \times \frac{\mu\text{g p OH g}}{\mu\text{g Amoxi St}} = F$$

Problema

$$\frac{\text{Area Amoxi Na}}{\text{Area p OHg}} \times \frac{\mu\text{g p OH g}}{\mu\text{g Amoxi Na}} = R$$

$$\text{g Amoxi Na} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times \text{cantidad inyectada (20 } \mu\text{l)}$$

$$\frac{R}{F} = \text{Potencia Amoxi problema } \%, \text{ como } \acute{\text{a}}\text{cida.}$$

Una vez calculada la potencia ácida de la amoxicilina problema, mediante la humedad y la relación de pesos moleculares, se determina la potencia de la amoxicilina sódica como producto seco en %.

Las soluciones problema se inyectan, como máximo, un minuto después de su preparación, a fin de evitar en lo posible los procesos de degradación.

14. Evaluación de métodos cuantitativos de amoxicilina mediante espectrofotometría.

En los estudios preliminares se ha empleado un método espectrofotométrico para valorar la amoxicilina con el fin de contrastar y observar la correlación con los datos obtenidos por CLAR. Posteriormente para los estudios de estabilidad se ha preferido emplear únicamente el método CLAR dado que aparte de su mayor rapidez y especificidad permite identificar los productos de degradación.

De los diversos métodos espectrofotométricos descritos en la bibliografía para la valoración de penicilinas (119, 120, 121, 122, 123, 124, 125), adoptamos el método oficial de la British Pharmacopeia 1.980, que se basa en un método descrito por Bundgaard (122) y luego modificado por el mismo (126), debido a que el método original no permite valorar penicilinas (amino penicilinas) que posean un grupo $-NH_2$ lateral. La modificación consiste en acetilar previamente dicho grupo, pues de lo contrario puede formar al parecer complejo con el $HgCl_2$.

La acetilación de la aminopenicilina da lugar al derivado α -acetamidobencilpenicilina, que mediante el ataque nucleofílico producido por el imidazol forma el derivado mercúrico mercaptida del ácido α -acetamidobencilpenicilénico, que se determina espectrofotométricamente a 325 nm. (Ver fig. 14).

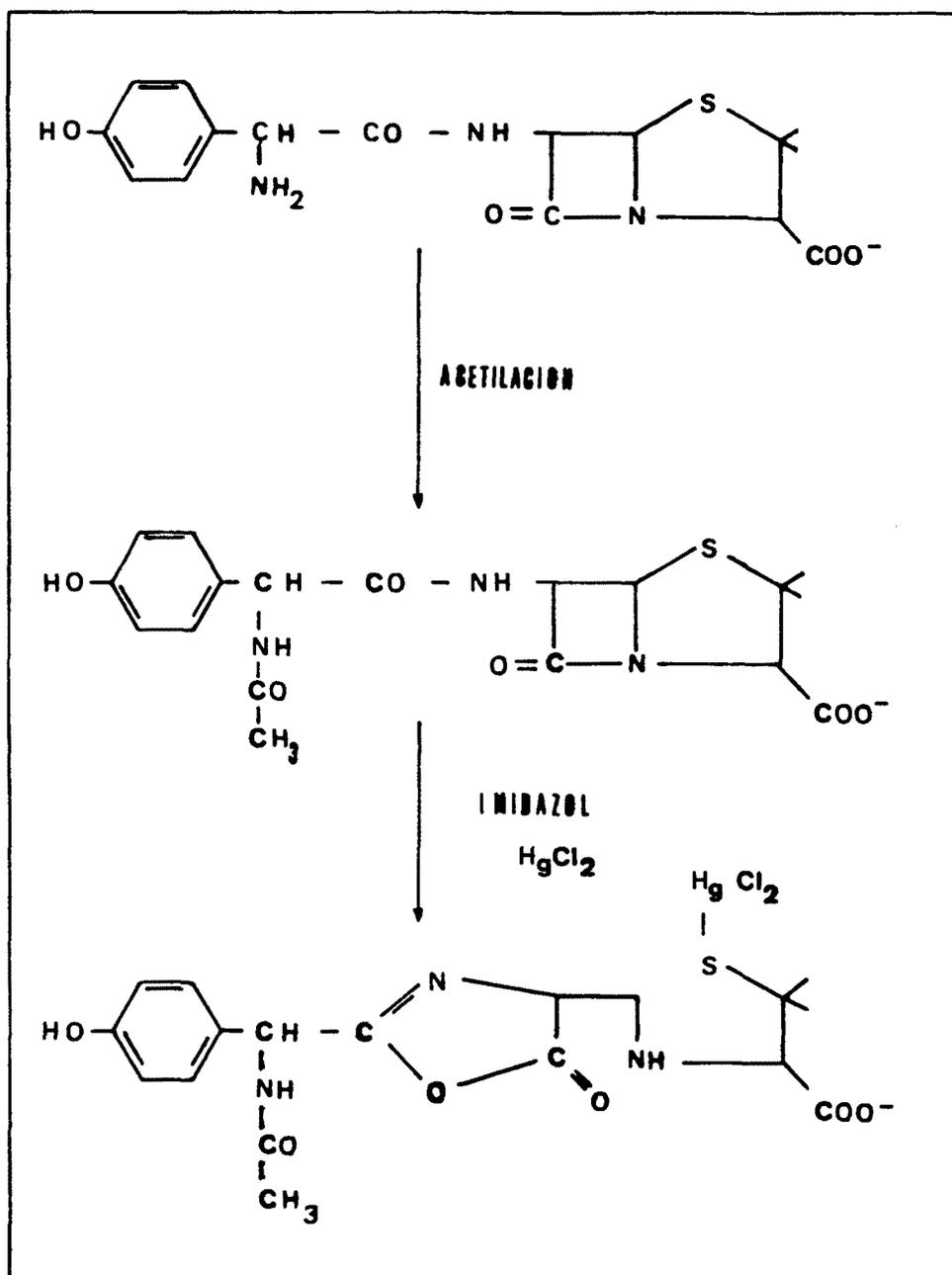


Figura nº 14 .

14.1 Método espectrofotométrico :

La técnica operatoria que hemos seguido es la siguiente (127):

Se disuelven 0,17 g de amoxicilina en 500 ml de agua, a 10 ml de esta solución (para la recta de calibrado se toman 5, 7, 10, 15 y 20 ml) se le añaden 10 ml de solución tampón de ácido bórico pH:9 y 1 ml de una solución de anhídrido acético dioxano (1:50), se homogeniza y se deja en reposo durante cinco minutos, transcurridos los cuales se enrasa con agua hasta 100 ml. De esta solución se toman 2ml y se colocan en un tubo, a los que se añade 10 ml de reactivo de imidazol-mercurio (disolver 41,25 g de imidazol en 300 ml de agua, añadir primero 50 ml de HCl 5 M y luego lentamente 50 ml de una solución al 0,27% de HgCl₂, ajustar el pH a 6,80 ± 0,05 con HCl 5 M, y completar hasta 500 ml de agua), se homogeniza y se sumerge el tubo en un baño a 60° durante 25 minutos exactos, transcurridos los cuales se enfría rápidamente hasta temperatura ambiente (solución A). Se hace un ensayo en paralelo con otros 2 ml de la solución primitiva, a los que se añaden 10 ml de agua (solución B). Leyéndose inmediatamente la absorbancia de ambas soluciones.

Como blanco de la solución A se emplea una solución que contiene 2 ml de agua y 10 ml de reactivo de imidazol-mercurio, y agua para la solución B.

El contenido de amoxicilina se calcula como diferencia entre las absorbancias de la solución A y B, y de la diferencia obtenida repitiendo la operación, empleando amoxicilina standard B.P.

$$\frac{\text{Abs}_{\text{prob}} \times \text{mg St} \times \text{Potencia St}}{\text{Abs}_{\text{St}} \times \text{mg Problema}} = \text{Potencia de Amoxicilina Acida en \%}$$

14.1.1 Validación:

A fin de determinar la linealidad del método, se emplean disoluciones de amoxicilina sódica desde $0,81 \times 10^{-4}$ a $3,24 \times 10^{-4}$ mols/l.

Los datos experimentales se hallan recopilados en el cuadro nº 17 .

Cuadro nº 17 .

CONCENTRAC. mols/l	$0,81 \times 10^{-4}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^{-4}$	$3,24 \times 10^{-4}$
ABSORBANCIAS	0,174	0,252	0,366	0,539	0,722
	0,181	0,261	0,366	0,530	0,723
	0,181	0,251	0,357	0,539	0,721
	0,178	0,257	0,362	0,537	0,716
	0,181	0,252	0,359	0,538	0,735

Con estos datos experimentales caracterizamos cada grupo estadísticamente, calculando, la desviación estandard y el coeficiente de variación (ver cuadro nº 18).

CONCENTR. mols/l	$0,81 \times 10^{-4}$	$1,13 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^{-4}$	$3,24 \times 10^{-4}$
N	5	5	5	5	5
\bar{X}	0,179	0,255	0,362	0,537	0,723
n	$2,7568 \times 10^{-3}$	$3,8262 \times 10^{-3}$	$3,6331 \times 10^{-3}$	$3,3823 \times 10^{-3}$	$6,2801 \times 10^{-3}$
C.V.	1,54	1,50	1,00	0,63	0,87

Cuadro n° 18.

Posteriormente calculamos mediante el método de los mínimos cuadrados, los parámetros de la recta de regresión definida por todos los puntos disponibles, tomando,

x	y
Concentración mol/l	Absorbancias

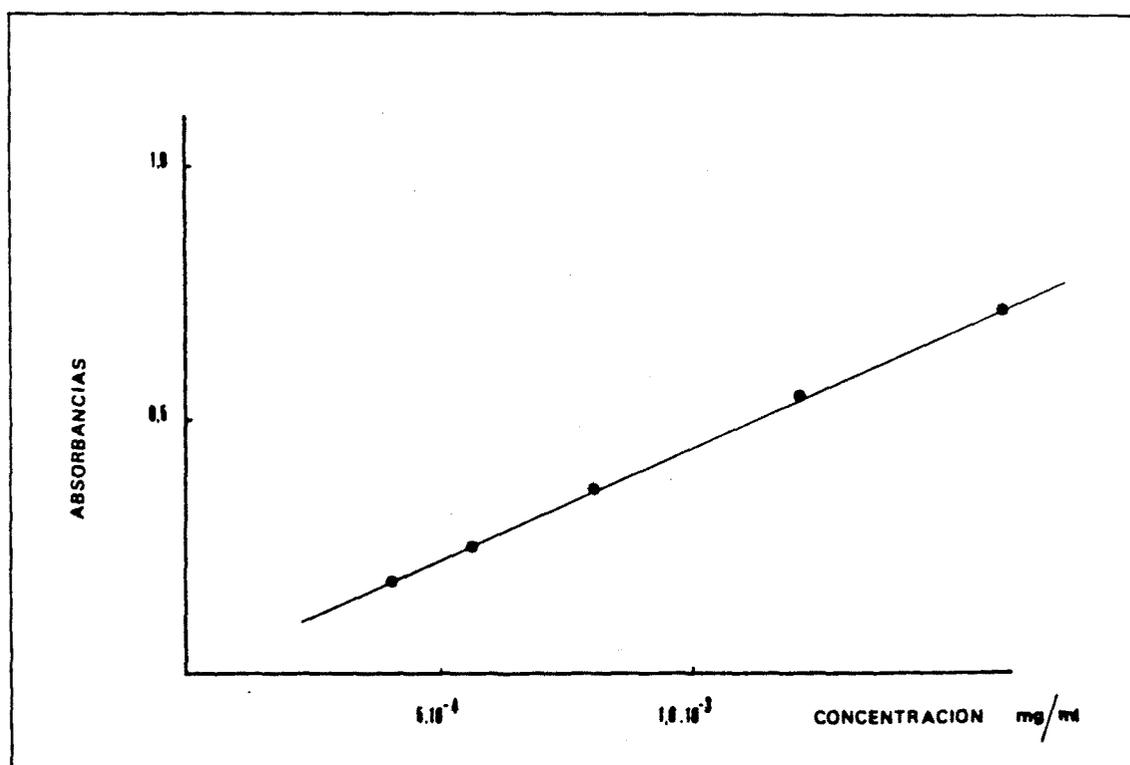
resultando, (gráfica n° 27),

$$\begin{aligned}
 r &= 0,9994 \\
 a &= -5,718 \times 10^{-4} \\
 b &= 2,228 \times 10^{-3} \\
 s &= 6,936 \times 10^{-3} \\
 s_a &= 3,207 \times 10^{-6} \\
 s_b &= 15,66
 \end{aligned}$$

Con estos datos determinamos el coeficiente de variación de a y de b, para ver la precisión del método, según,

$$\text{c.v. de } a = \frac{s_a}{a} \cdot 100 = 0,56$$

$$\text{c.v. de } b = \frac{s_b}{b} \cdot 100 = 0,70$$



Gráfica nº 27 - Recta calibración método espectrofotométrico

15. Método analítico de determinación de disolventes residuales. Cromatografía de gases HEAD SPACE:

En nuestro estudio sobre la amoxicilina sódica, intentamos mejorar su calidad y aumentar su estabilidad mediante un proceso de liofilización aplicando un sistema acuoso-orgánico, empleando para ello disolventes tales como: acetato de etilo y tert-butanol.

El análisis del disolvente residual es un problema importante en la industria farmacéutica debido a las estrictas leyes a las que está sometida.

A excepción de un trabajo (128), los estudios descritos en la bibliografía que hemos hallado no son de aplicación farmacéutica. Por dicho motivo desarrollamos un método analítico por cromatografía de gases HEAD SPACE, para determinar cuantitativamente el contenido de disolvente residual de los viales de amoxicilina sódica fabricados.

El análisis por HEAD SPACE acoplado a la cromatografía de gases, no requiere la extracción de disolvente y permite detectar con alta precisión cantidades de menos de 1 p.p.m. de disolvente. El análisis puede efectuarse directamente sobre la sustancia medicamentosa o en una solución de la sustancia medicamentosa en un líquido de punto de ebullición alto.

Para ello hemos empleado un aparato de cromatografía de gases con HEAD SPACE cedido gentilmente por el laboratorio del Dr. Esteve, que consta de:

- Perkin-Elmer, Gas Chromatograph, mod. Sigma 3B/HS6, control ionización a la llama.
- Accesorio Perkin-Elmer semiautomático de HEAD SPACE.
- Recorder Hitachi mod. S-61

Todos los análisis se han realizado bajo las condiciones cromatográficas siguientes:

- Temperatura de la muestra : 60°C
- " " " columna : 80°C
- " " " inyector : 170°C
- " " " detector : 170°C
- Columnas de vidrio (Teknokroma) de 1/4", con soporte sólido, Gas Chrom Q 80/100, fase líquida 3%, SE-30, temperatura máxima 300°C, polaridad positiva.
- Tiempo de presurización : 4 minutos.
- Tiempo de calentamiento de la muestra: 20 minutos.
- Flujo de hidrógeno : 22 ml/min.
- " " helio : 22 ml/min.
- Velocidad del papel: 5 mm/min.

Para determinar la linealidad del método debe de tenerse en cuenta que:

- 1) La concentración de disolvente orgánico de las soluciones patrón debe estar ajustada a la cantidad de disolvente orgánico residual supuestamente presente en los viales a analizar.
- 2) A fin de que la tensión de vapor de las soluciones patrón y problema sea lo más semejante posible, las soluciones patrón deben de contener la misma cantidad de amoxicilina sódica que las soluciones problema, pero exenta como es lógico de disolvente orgánico, es decir, amoxicilina sódica liofilizada en medio acuoso.

Como veremos más adelante, nosotros hemos obtenido amoxicilina sódica liofilizada en viales a una concentración del 10 y 20 % respectivamente, mediante dos procesos de liofilización en sistema acuoso-orgánico, uno empleando acetato de etilo y otro tert-butanol.

Por dicho motivo, hemos realizado una recta de calibrado para cada uno de ellos. Teniendo en cuenta lo que hemos mencionado anteriormente, suponemos que en todos los viales (10 y 20%) P/V de amoxicilina sódica, el contenido promedio de disolvente residual en el caso del acetato de etilo es de alrededor del 2-3% y alrededor del 1% cuando se emplea tert-butanol (gráfica nº 30).

15.1 Validación del método con acetato de etilo.

Soluciones patrón: Se preparan soluciones acuosas de acetato de etilo al 0,2, 0,3, 0,5, 0,8 y 1,1 %. De cada una de ellas se toman 2 ml. y se introducen en un vial, al que se añaden 200 mg de amoxicilina sódica, recién obtenida por liofilización en medio acuoso. Una vez disuelta la amoxicilina, se cierran los viales con tapón de butilo y capsula de aluminio. Procediéndose a continuación a realizar el HEAD SPACE. Se realizan determinaciones de 5 viales por concentración.

Los resultados obtenidos se hallan recopilados en el cuadro nº 19 .

Concentración	Longitud de los picos en cm				
	0,2 %	1,52	1,53	1,54	1,51
0,3 %	2,62	2,64	2,60	2,61	2,63
0,5 %	4,32	4,31	4,33	4,33	4,33
0,8 %	8,10	8,15	8,11	8,05	8,02
1,1 %	11,58	11,66	11,59	11,72	11,64

Cuadro nº 19 .

Con estos datos experimentales caracterizamos cada grupo, estadísticamente (Cuadro n° 20).

Concentración	\bar{X} longitud cm	σ_n	N	c.v.
0,2 %	1,52	$1,1 \times 10^{-2}$	5	0,76
0,3 %	2,62	$1,4 \times 10^{-2}$	5	0,54
0,5 %	4,32	$1,1 \times 10^{-2}$	5	0,27
0,8 %	8,08	$4,5 \times 10^{-2}$	5	0,57
1,1 %	11,63	$8,0 \times 10^{-2}$	5	0,70

Cuadro n° 20 .

Posteriormente, calculamos por el método de los mínimos cuadrados, los parámetros de la recta de regresión definida por todos los puntos disponibles, tomando, (ver gráfica n° 28)

X	y
concentración %	longitud cm

resultando:

$$\begin{aligned}
 r &= 0,9983 \\
 a &= -0,8696 \\
 b &= 11,19 \\
 s &= 0,2351 \\
 s_a &= 8,2174 \times 10^{-3} \\
 s_b &= 0.0178
 \end{aligned}$$

15.2 Validación del método con tert-butanol:

Las soluciones patrón de tert-butanol se preparan de idéntica manera que las de acetato de etilo pero a unas concentraciones de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, y 1,2 % .

Los resultados experimentales se hallan recogidos en el cuadro nº 21 .

Caracterizando estadísticamente estos datos experimentales, cuadro nº 22 .

Posteriormente calculamos por el método de los mínimos cuadrados, los parámetros de la recta de regresión definida por todos los puntos disponibles, tomando, (ver gráfica nº 29).

x	y
concentración	longitud del pico en cm

resultando,

Concentraciones	Longitud pico en cm	
0,2 %	0,726 0,74 0,74 0,72 0,69	
0,4 %	1,47 1,45 1,50 1,47	1,48
0,6 %	2,32 2,32 2,21 2,43	2,33
0,8 %	3,15 3,17 3,19	3,10 3,15
1,0%	4,10 4,13 4,05	4,11 4,10
1,2%	5,15 5,21 5,15	5,06 5,15

Cuadro n° 21 .

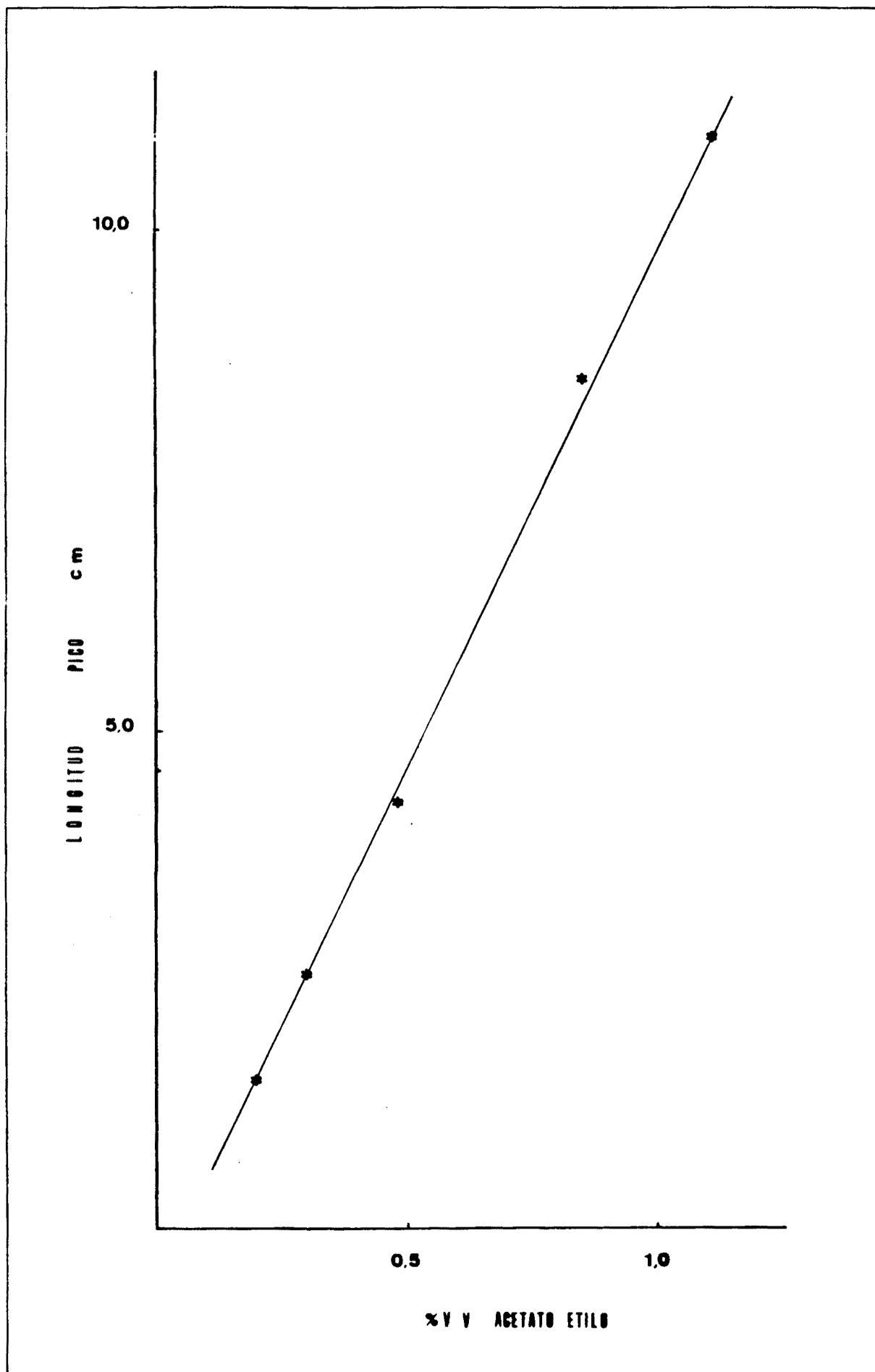
Concentración	\bar{x} long.cm	σ_n	N	c.v.
0,2 %	0,72	$1,8 \times 10^{-2}$	5	2,54
0,4 %	1,47	$1,6 \times 10^{-2}$	5	1,08
0,6 %	2,32	$7,0 \times 10^{-2}$	5	3,00
0,8 %	3,15	$3,0 \times 10^{-2}$	5	0,95
1,0 %	4,11	$2,6 \times 10^{-2}$	5	0,64
1,2 %	5,14	$4,8 \times 10^{-2}$	5	0,93

Cuadro n° 22 .

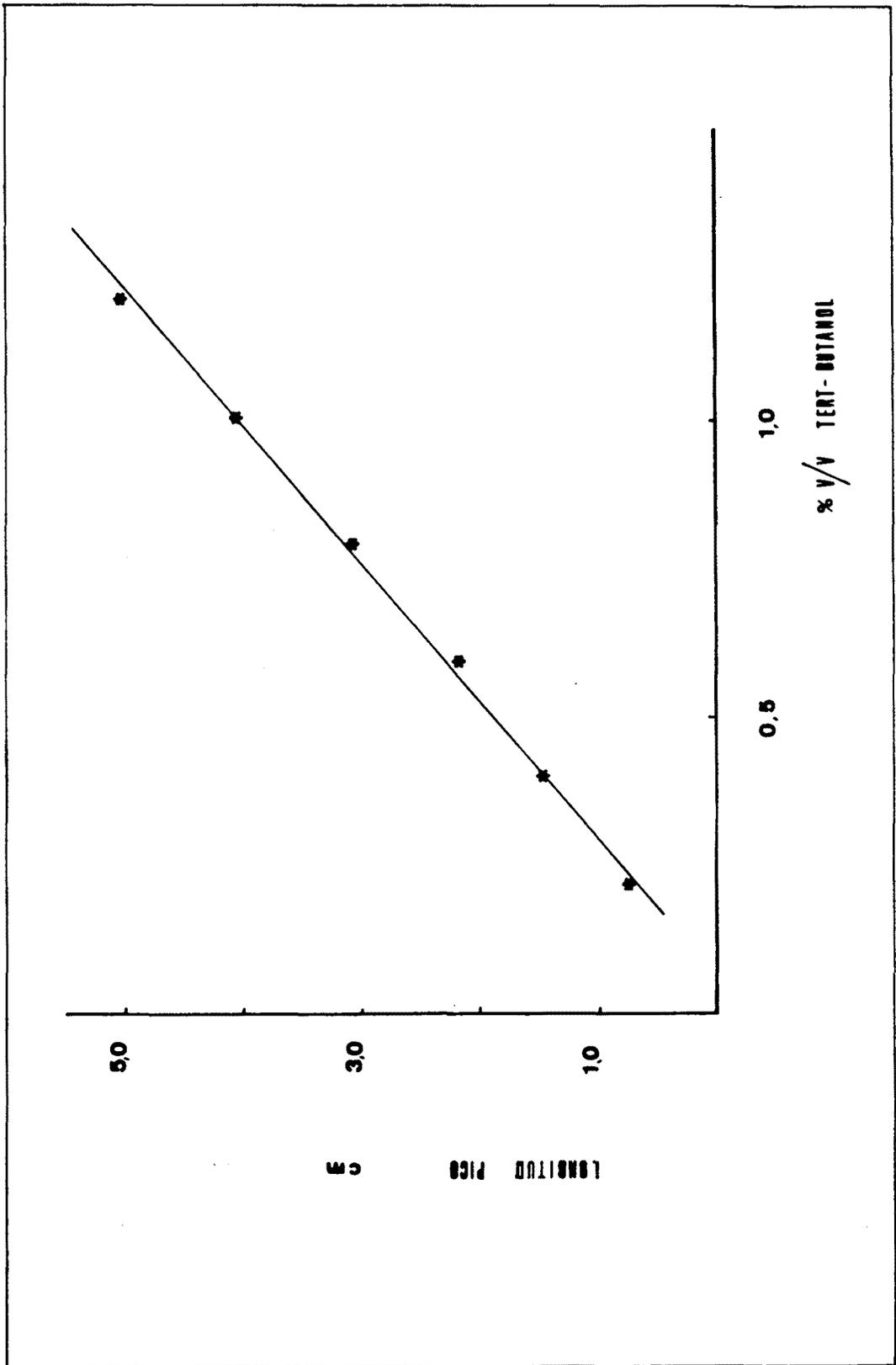
$$\begin{aligned}
 r &= 0,99833 \\
 a &= - 0,2625 \\
 b &= 4,4017 \\
 s &= 0,0961 \\
 s_a &= 0,040 \\
 s_b &= 0,0514
 \end{aligned}$$

Cuando analizamos el contenido de disolvente orgánico residual de un vial de amoxicilina sódica que contenga acetato de etilo o tert-butanol, las soluciones problema se preparan del siguiente modo :

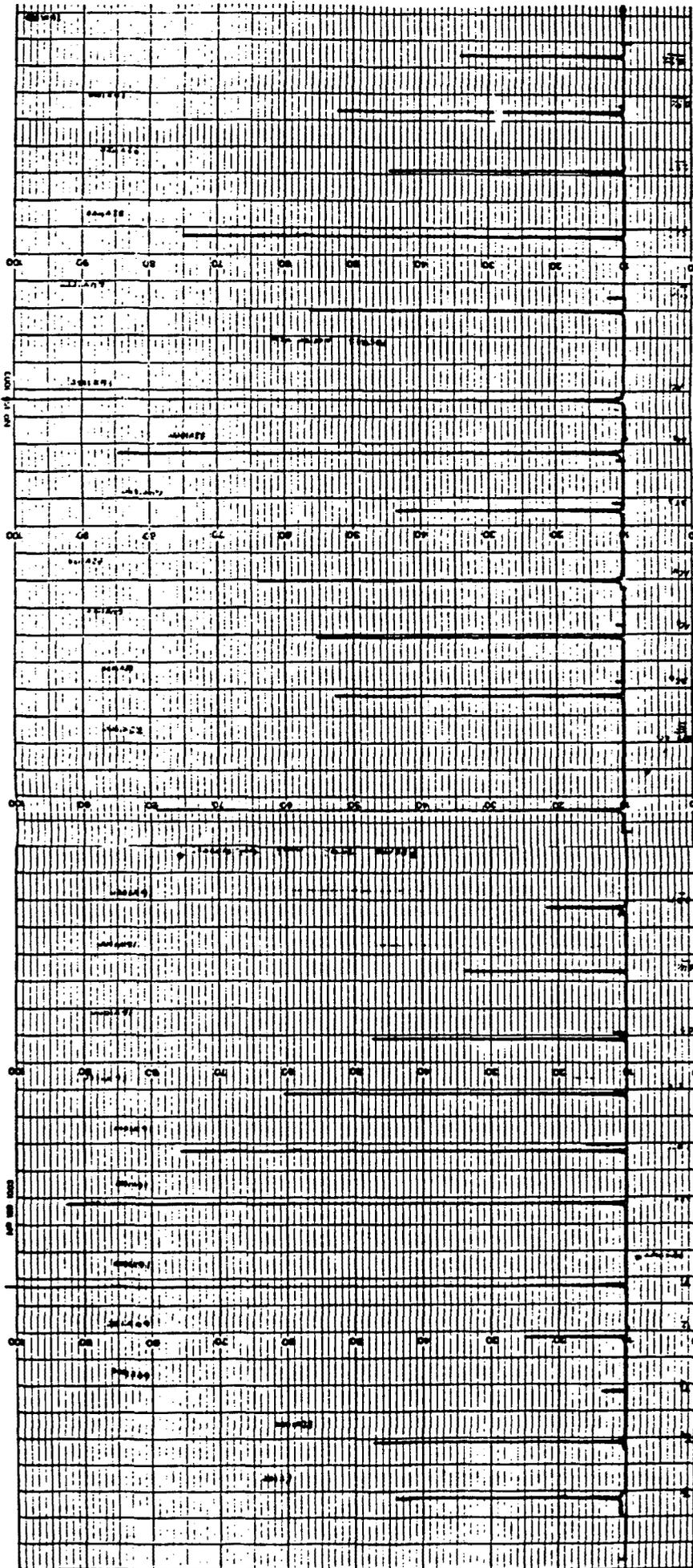
Se disuelven 200 mg de amoxicilina sódica problema en 2 ml de agua destilada en un vial idéntico a los empleados para preparar las soluciones patrón, a fin de que la cámara de aire sea la misma para que las tensiones de vapor de los viales patrón y problema sean las más próximas posibles. Una vez preparados los viales, se cierran igual que los viales patrón.



Gráfica n° 28 : Recta calibrado acetato etilo.



Gráfica nº 29 : Recta calibrado tert-butanol .



Gráfica nº 30 . HEAD SPACE tert-butanol y acetato de etilo .

16. Iodimetría para determinación de productos de degradación
(S.A.I.):

El método que se ha empleado es el de la British Pharmacopeia add. 1.982 (127).

La técnica operativa utilizada es la siguiente:

Se disuelven 0,1 g de amoxicilina en 100 ml de una solución de tampón de fosfatos pH:7. De ella se toman 5 ml a los que se añaden 5 ml de una solución de tampón de fosfato pH:4 y 5 ml de solución de yodo 0,01 N. Se cierra el recipiente, se homogeniza y se deja en reposo al abrigo de la luz durante 10 minutos. Transcurridos los cuales se valora con solución de tiosulfato sódico 0,01 N usando mucílago de almidón como indicador añadido cerca del final de la valoración. Posteriormente se efectúa un ensayo en blanco, valorando una solución de 5 ml de solución tampón pH: 4 y 5 ml de solución de yodo 0,01 N.

La diferencia de ml de tiosulfato sódico 0,01 N entre el blanco y el problema, son los gastados por las sustancias que absorben yodo. Según indica la B.P. las S.A.I. no deben exceder del 5% calculado en referencia a la amoxicilina ácida.

Para ello:



16.1 Validación :

Para determinar la precisión del método se realizan 10 valora

ciones consecutivas. Caracterizando posteriormente la muestra estadísticamente. Los resultados experimentales se hallan recopilados en el cuadro nº 23 .

SAI en %	5,80
	5,82
	5,78
	5,82
	5,76
	5,79
	5,81
	5,83
	5,85
	5,79
N	10
σ_n	$2,5 \times 10^{-2}$
\bar{x}	5,80
c.v.	0,45

Cuadro nº 23 .

17. Determinación del punto eutéctico (ATD) de soluciones acuosas y acuoso-orgánicas:

Para que un proceso de liofilización pueda ser conducido de la forma lo más completa, satisfactoria y económica posible, es necesario conocer la temperatura exacta de congelación de la solución a liofilizar. Ello permite asegurar la cristalización completa de la misma así como las reacciones endo y exotérmicas que afectarán al producto durante el proceso de liofilización.

El Análisis Térmico Diferencial (ATD) proporciona los datos necesarios de una solución (ver pág.66) para que su proceso de liofilización reúna los requisitos antes mencionados.

17.1 Método:

El aparato que hemos empleado nos ha sido cedido gentilmente por el Dr. Solé Peix (19).

El dispositivo consta de un bloque metálico, calefactor, caja isotérmica y un registrador XY. El bloque metálico tiene cuatro cavidades de 1,5 cm de diámetro y 4,5 cm de profundidad. En dos de ellas se disponen 2 ml de la solución problema y en los otros dos, 2 ml de agua bidestilada empleada como líquido de referencia.

Como puede observarse en la fig. 15, sobre este bloque va acoplada otra pieza constituida por cuatro termopares de Fe-constantan, cada uno de los cuales penetra en una cavidad siempre la misma, debido al diseño del dispositivo que sólo permite una posición.

El valor de la temperatura de la solución problema lo mide la X del registrador. Para ello se dispone de dos termopares colocados uno en la cavidad donde está la solución problema, conectado en serie con otros dos, uno que se halla sumergido durante toda la operación en un baño de hielo a 0°C, y otro a una cavidad con 2 ml de agua bidestilada.

De las dos cavidades restantes, en una se coloca 2 ml de solución problema y en la otra 2 ml de agua bidestilada, sus correspondientes termopares van conectados al eje de las Y. Mientras las temperaturas de la solución problema y del agua bidestilada son las mismas, no existe diferencia de potencial en los bornes de Y, pero cualquier cambio que se produzca en la solución problema, bien sea una reacción endotérmica (p. ej., fusión) o exotérmica (p. ej., cristalización), producirá una diferencia de potencial en los extremos que van al registrador, que se traducirá en un movimiento de la aguja inscriptora.

Una vez dispuesta la solución problema y el agua bidestilada en el bloque metálico, se acopla el conjunto con los termopares tal como puede verse en la fig.15, introduciéndose posteriormente en la caja isotérmica. A continuación se procede a verter la fuente de frío utilizada, en nuestro caso empleamos nitrógeno líquido, directamente desde su depósito al interior de la caja isotérmica hasta casi cubrir el bloque metálico.

Empleando nitrógeno líquido podemos alcanzar una temperatura de hasta -196°C, que es la temperatura a la que hierve el nitrógeno líquido a presión atmosférica.

Una vez agotado el nitrógeno líquido (curva de congelación), se extrae el bloque metálico de la caja isotérmica, y se introduce en el bloque calefactor, que conviene enfriarlo previamente para que el cambio de temperaturas no sea tan brusco. Procediendo a continuación a suministrar calor (fase de calentamiento ATD)

mediante una resistencia de 100 V.

La fase de congelación y de calentamiento ATD duran treinta y noventa minutos aproximadamente.

Nosotros hemos determinado el punto eutéctico de la amoxicilina sódica en solución acuosa y en las soluciones acuoso-orgánicas con los disolventes empleados en nuestro estudio experimental.

Para calibrar el aparato se emplea una solución de NaCl al 10%, cuyo eutéctico se halla descrito en la Bibliografía (19), gráfica nº 3. Las concentraciones de amoxicilina sódica y de los disolventes son las empleadas en el estudio experimental. En el caso de las soluciones acuoso-orgánicas determinamos los puntos eutécticos de las soluciones que contenían la concentración superior de disolvente.

Las gráficas de los puntos eutécticos se hallan en las págs. 176 a 182 en los cuadros 24, 25 y 26 se hallan descritos los resultados obtenidos.

% P/V de amoxicilina sódica en sol. acuosa	punto eutéctico °C
10	- 4
20	- 10,4

Cuadro nº 24 .

% P/V Amoxicilina sódica en sol. acuoso-orgánica	% V/V de Acetato de etilo	p. eutéctico °C
10	8	- 8
20	8	-12

Cuadro n° 25 .

% P/V Amoxicilina sódica en sol. acuoso-orgánica	% V/V tert-butanol	p. eutéctico °C
10	20	- 15,2
10	40	- 16,8
20	40	- 20,1

Cuadro n° 26 .

En el cuadro anterior se halla reflejado también el punto eutéctico de una solución acuoso-orgánica al 10 % P/V de amoxicilina sódica con un 20 % V/V tert-butanol, que como según veremos más adelante es la empleada en los estudios de estabilidad.

Para ver la utilidad del ATD, supongamos que queremos liofilizar una solución acuosa de amoxicilina sódica al 10% P/V: (gráfica n° 32)

- Temperatura de congelación: La solución debe enfriarse a una temperatura igual o inferior a $- 20^{\circ}\text{C}$. De esta forma se tiene la seguridad de que la solución está totalmente congelada.
- Temperatura a la que podrá llegarse a calentar el producto durante el curso de la liofilización: Como máximo a $- 8^{\circ}\text{C}$ para tener la seguridad de que ninguna zona de fusión aparecerá en el producto.

Como se comprende, estos valores son extremos. Cuando se efectúa la liofilización, para mayor seguridad habrán de darse los márgenes necesarios a estos valores.

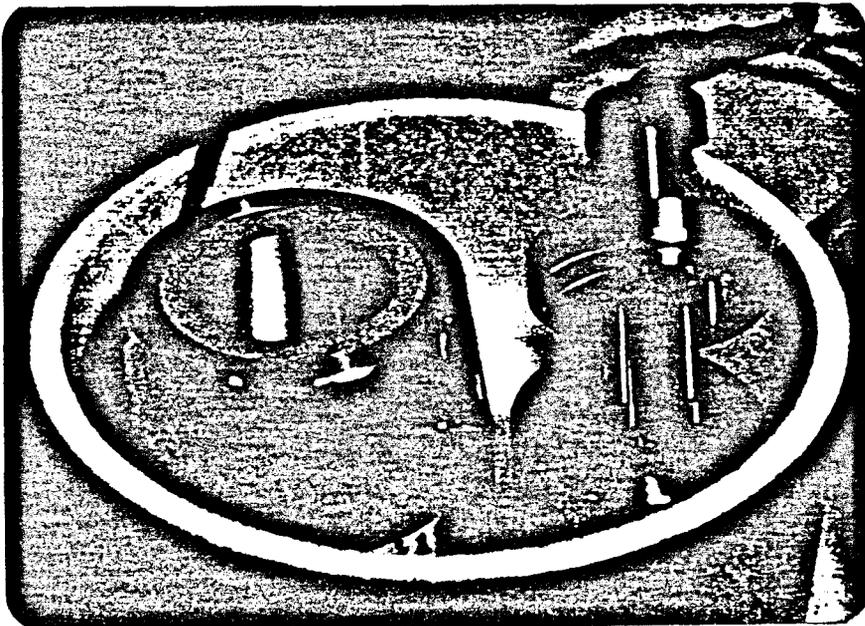


Figura n° 15 .

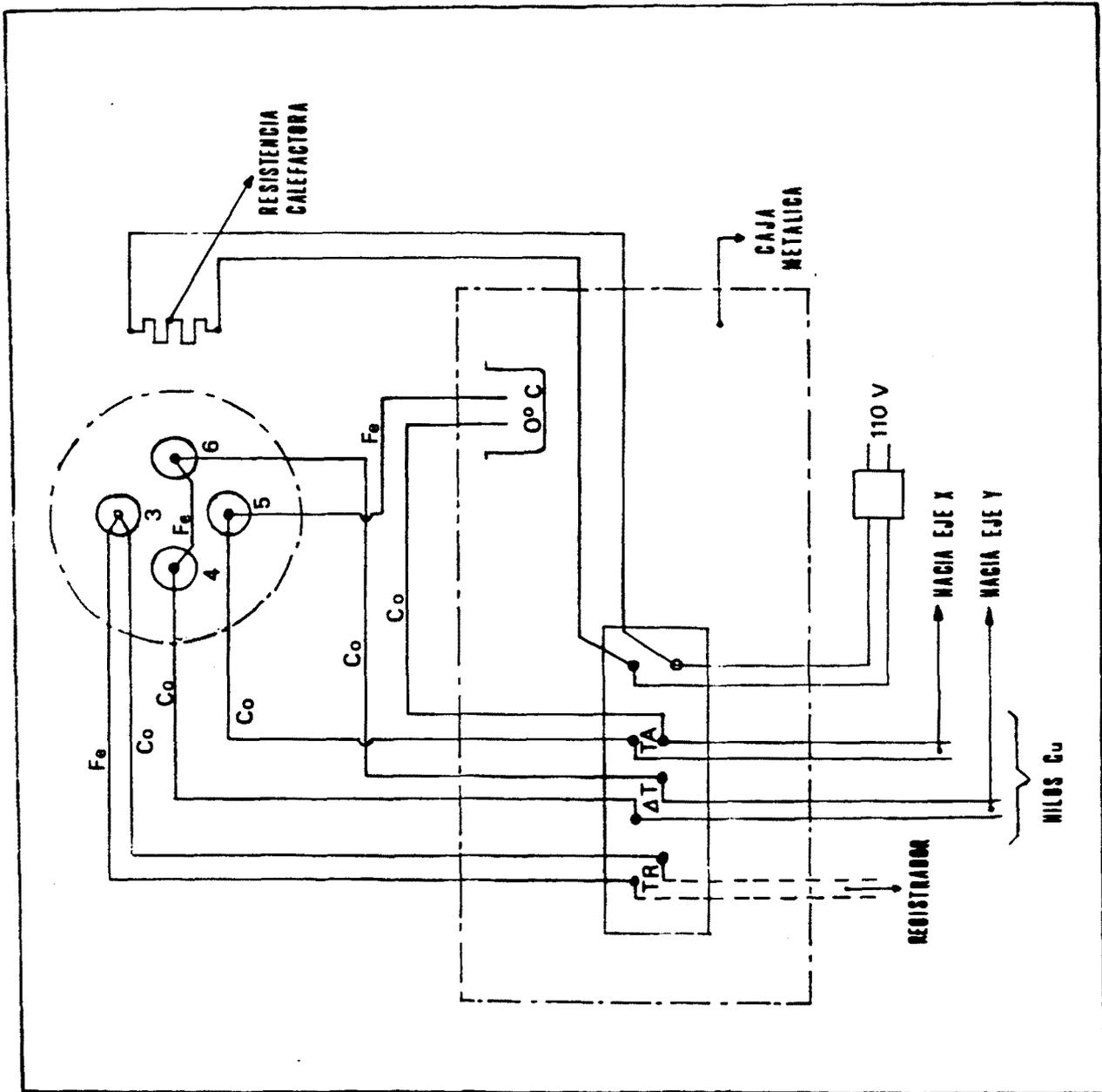
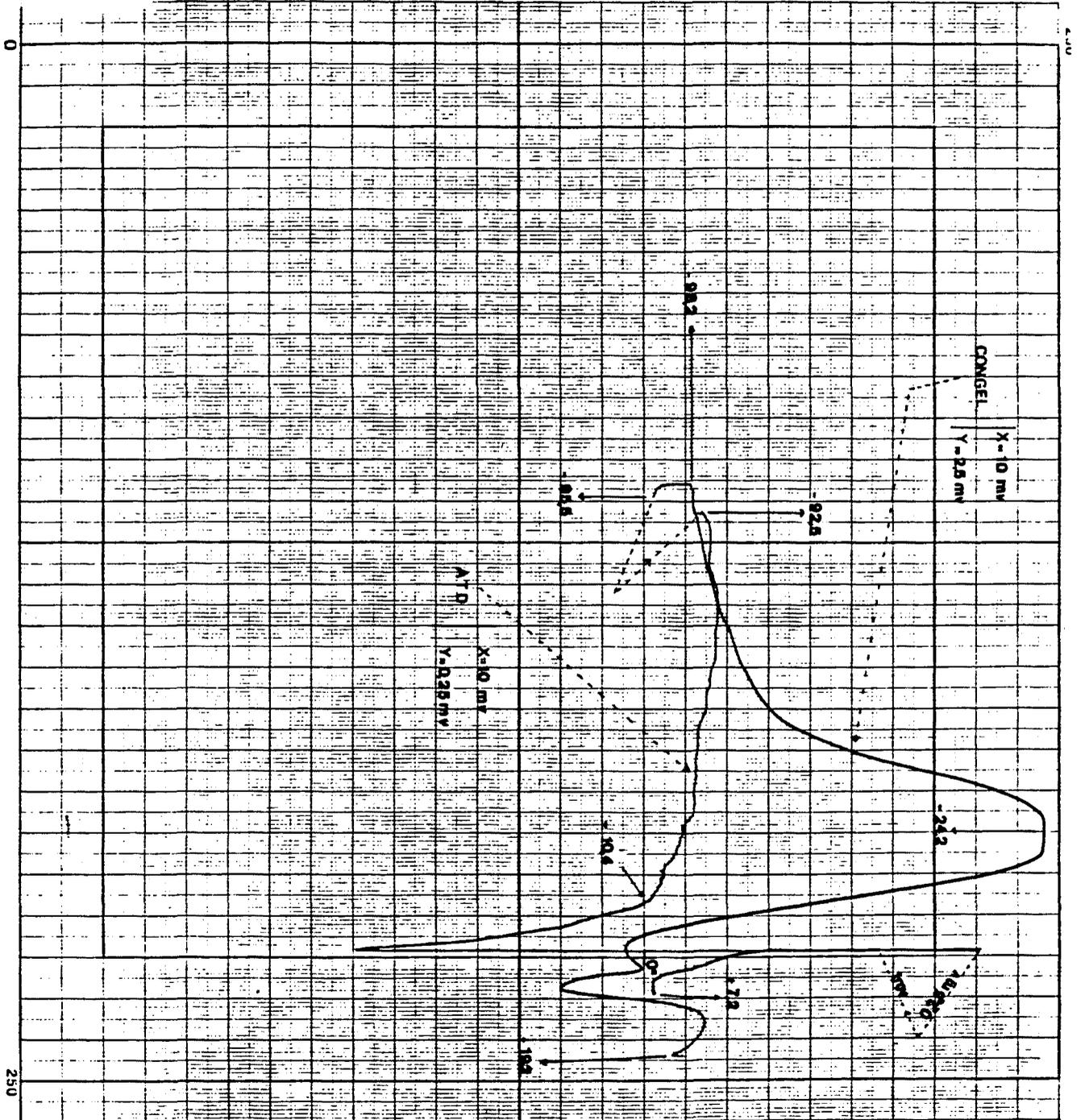


Figura nº 16 .

PLIER SUR CETTE LIGNE

SIERAM
MARTELL
TYPE
XIGC

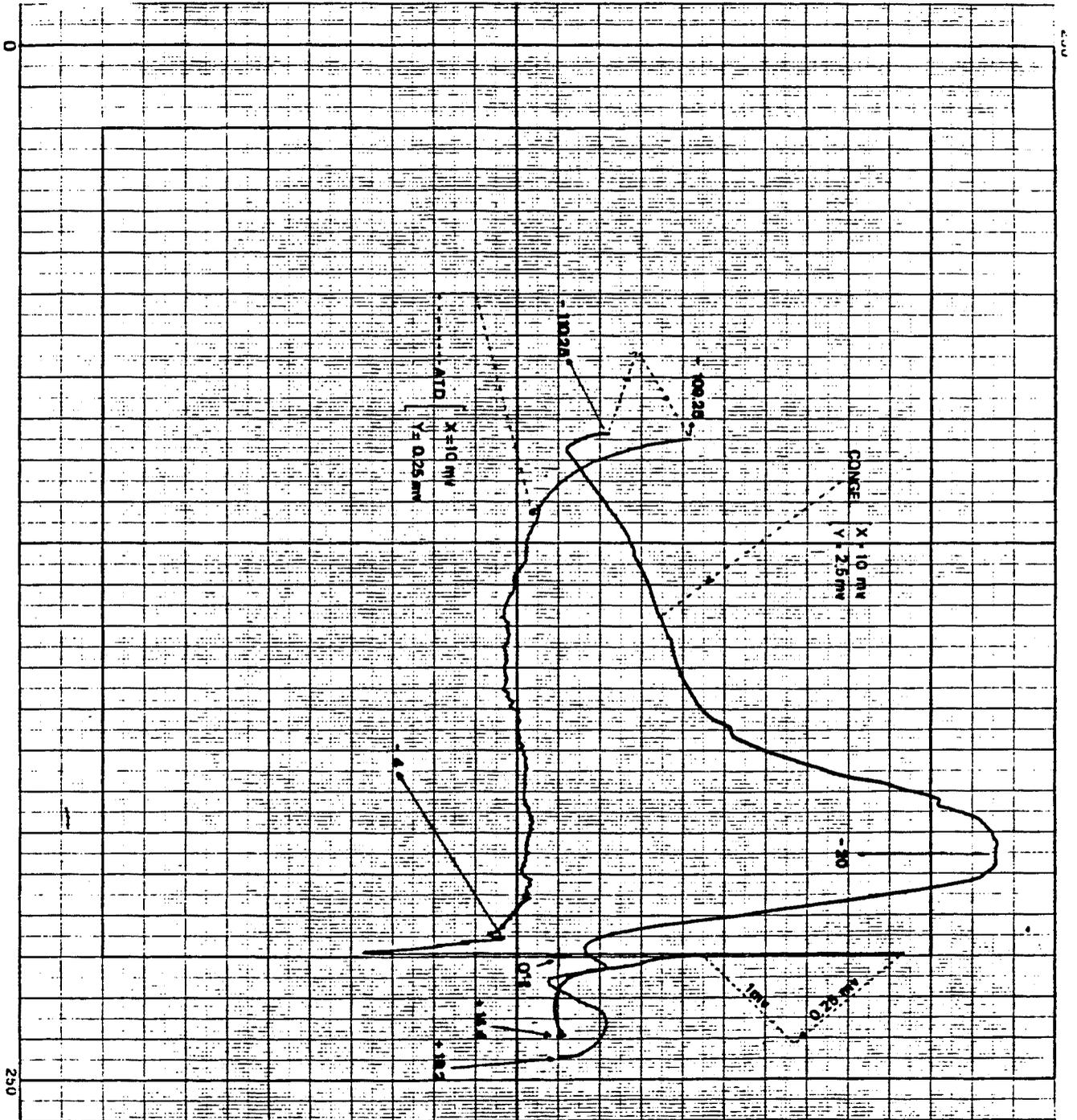


DATE : _____ CONDITIONS D'ESSAIS : Anoxicilina sódica en sol.acuosa 20 % P/V. OPERATEUR : _____
ESSAIS N° : _____

Gráfica nº 31 .

PLIER SUR CETTE LIGNE

SEPRAM
PANDS
TYPE
X100C



DATE

CONDITIONS D'ESSAIS: Aroxicilina sódica al 10% P/V en solución acuosa.

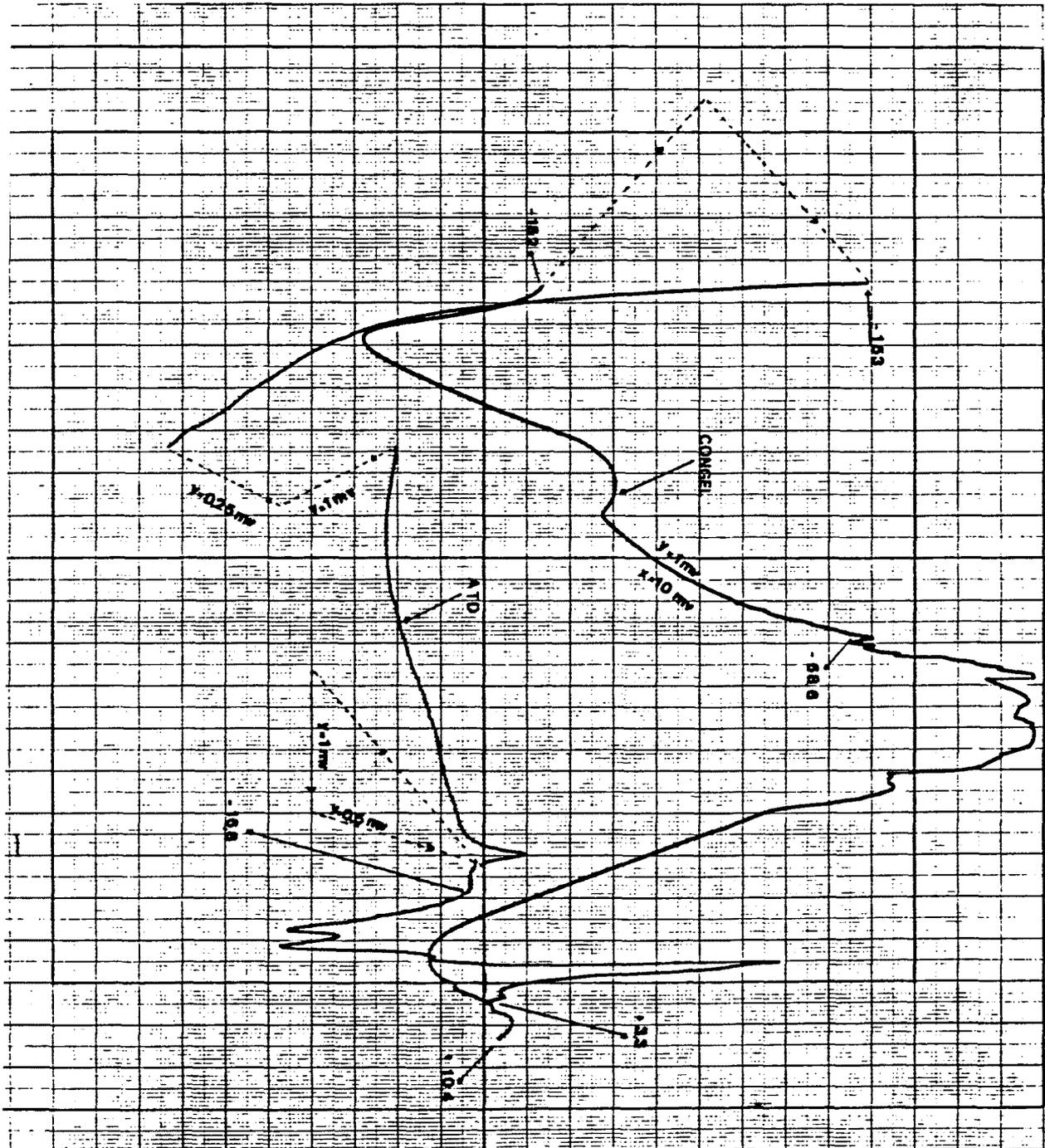
OPERATEUR

ESSAIS N°

Gráfica nº 32 .

PLIER SUR CETTE LIGNE

SERRAM
PARIS
TYPE

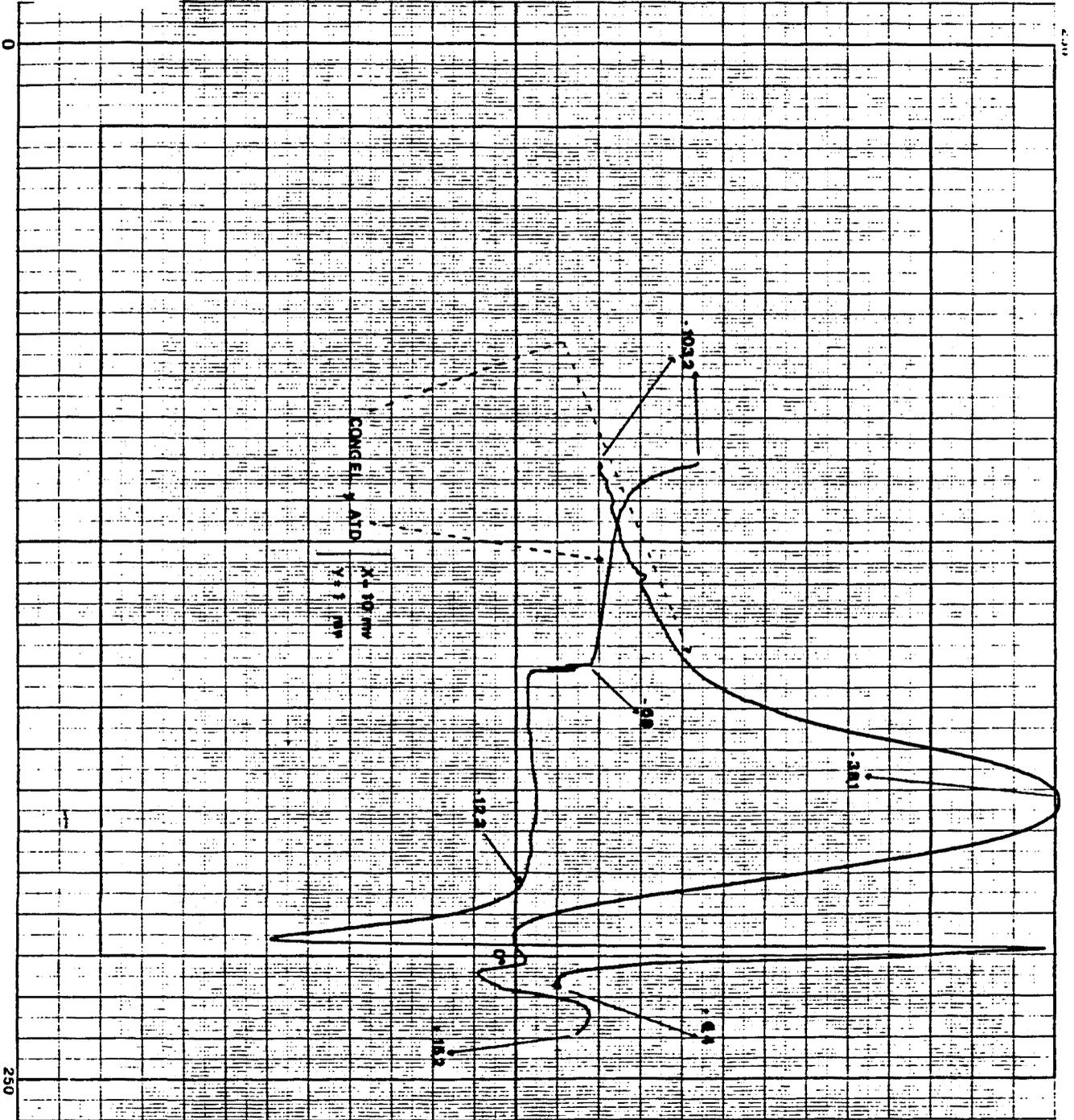


DATE : _____ CONDITIONS D'ESSAIS : Amoxicilina sódica 10% P/V en solución acuosa con 40% V/V de tert-butanol. OPÉRATEUR : _____
AIS N° _____

Gráfica nº 33 .

PLIER SUR CETTE LIGNE

SERIAM
PARIS
TYPE
XIGC



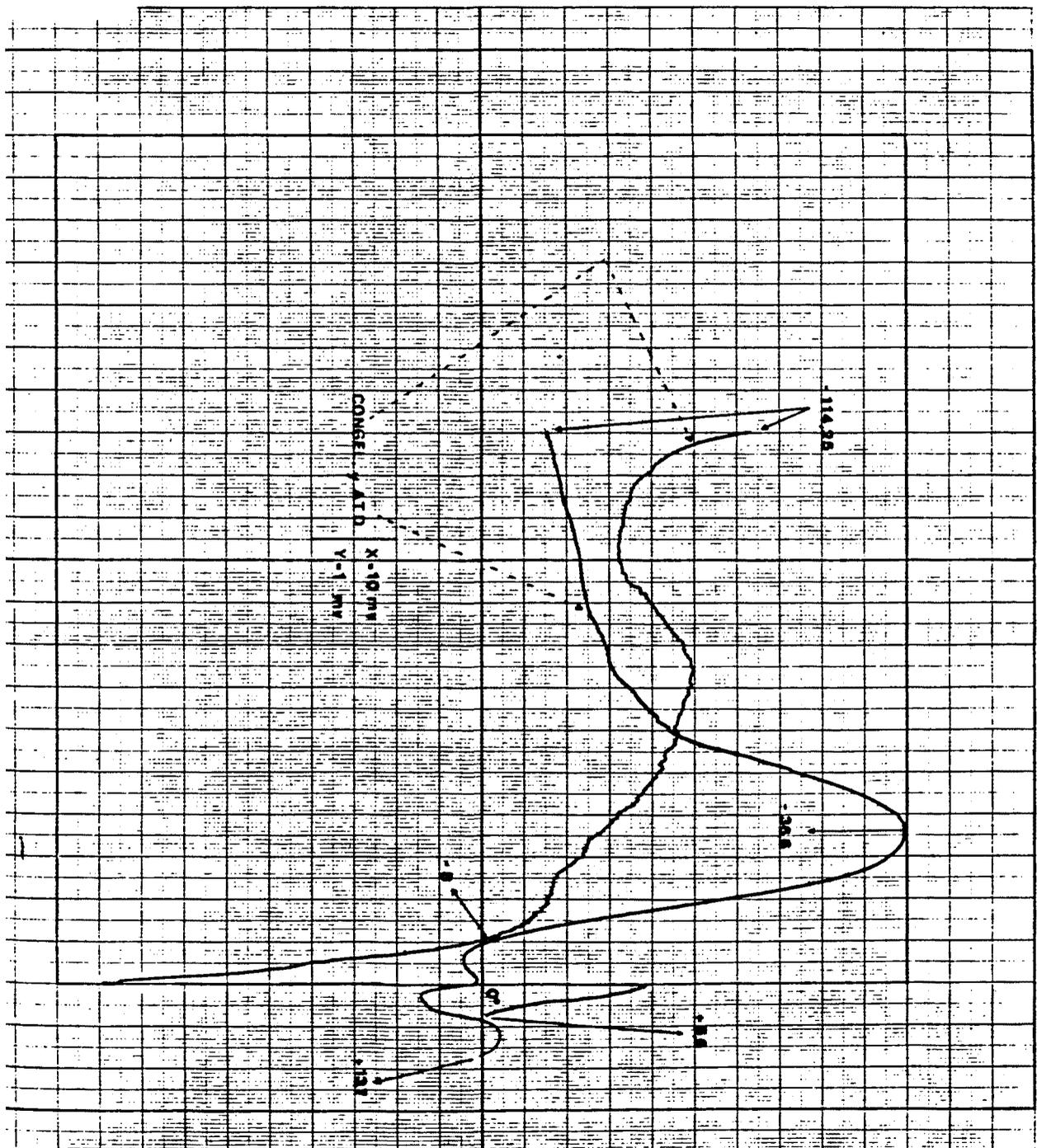
DATE: _____ CONDITIONS D'ESSAIS: Amoxicilina sódica 20% P/V en solución . OPERATEUR: _____

ESSAIS N° _____ acuosa con 8% V/V de acetato de etilo.

Gráfica nº 34 .

PLIER SUR CETTE LIGNE

SERIAM
PARIS
TYPE
K 1157



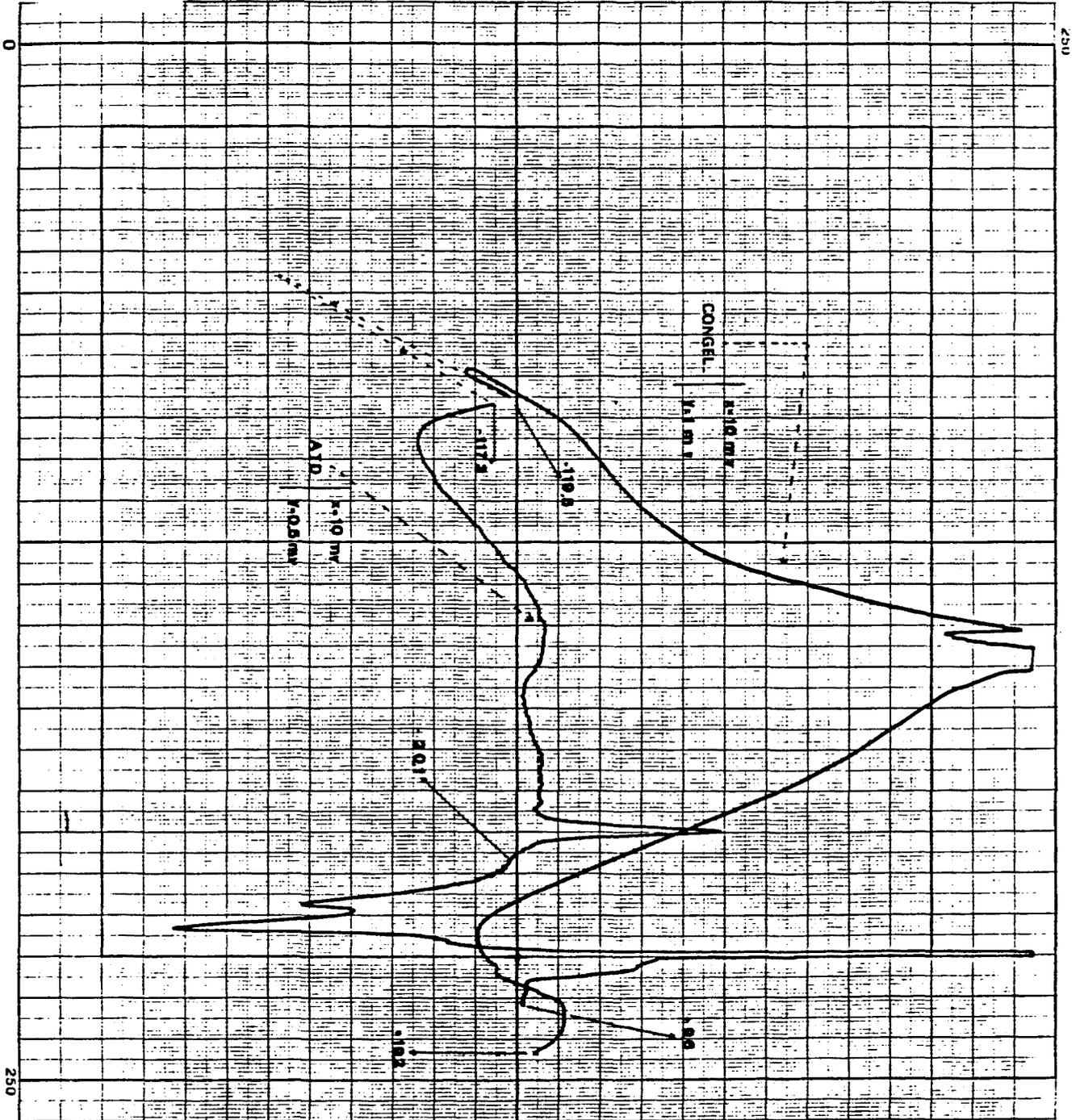
DATE: _____ CONDITIONS D'ESSAIS: Aroxilina sódica 10% P/V en solución acuosas con 8% V/V de acetato de etilo. OPERATEUR: _____

AIS N° _____

Gráfica nº 35 .

PLIER SUR CETTE LIGNE

SERRAM
PAINI,
TYPE
XIGC



DATE : _____ CONDITIONS D'ESSAIS : Amoxicilina sódica 20% P/V en solución _____ OPERATEUR : _____
acuosa con 40 % V/V de tert-butanol.

ESSAIS N° _____

Gráfica nº 36 .

18. Otras técnicas analíticas utilizadas:

En nuestro estudio experimental hemos empleado además técnicas tales como R.M.N., I.R., para observar si los lotes de amoxicilina sódica sufrían alguna alteración como por ejemplo, destrucción del anillo lactama, debido a los procesos de obtención.

La humedad de los lotes la hemos determinado mediante Karl-Fischer.

19. Métodos de obtención de amoxicilina sódica:

El estudio experimental está orientado fundamentalmente a encontrar la metódica más idónea, para obtener amoxicilina sódica lo más pura posible y que a la vez podamos aumentar su estabilidad y fecha de caducidad.

Se sabe que durante el proceso de liofilización de estos productos betalactámicos, se producen procesos de degradación, que pueden ser derivados de una abertura hidrolítica del anillo betalactámico.

Este trabajo está dirigido en primer lugar al estudio de los procesos de liofilización de amoxicilina sódica en:

- disolución acuosa
- disolución acuosa-orgánica

y a la obtención de amoxicilina sódica por precipitación.

Estudiando la influencia en los procesos de liofilización de factores tales como;

- la concentración de amoxicilina
- el pH de las disoluciones
- la temperatura de disolución
- el tiempo de disolución

19.1 Procesos de liofilización:

19.1.1 Condiciones de los procesos de liofilización;

Se ha trabajado a dos concentraciones de amoxicilina, al 10% y 20 % p/v, expresadas como amoxicilina base. La equivalencia en amoxicilina trihidrato es de:

$$1,0 \text{ g de amoxicilina base} \equiv 1,15 \text{ g de amoxicilina trihidrato}$$

Para que los resultados no puedan estar influenciados por variaciones del proceso de liofilización debidas al aparato, cada lote de igual concentración de amoxicilina sódica se ha liofilizado conjuntamente.

El volumen de solución a liofilizar por vial lo fijamos en 3,5 cc , lo que da una altura de capa a liofilizar aproximada de unos 12 mm.

Las características del material de envasado empleado durante todo el estudio experimental son las siguientes: (Fig. nº 17)

- VIAL : Fabricante: Manuel Pérez. Lote: N-5143.
 Diámetro: 20/21 mm
 Altura: 37 mm
 Vidrio Blanco
 Capacidad 90%: 5 ml
 Fig. nº

Tipo de vidrio: 1) Volumen de HCl 0,01 N utilizado para la valoración de 100 ml de solución: 1,0 ml

Tipo 1 ó 2, según método de superficie de la Farmacopea Europea 2ª edición.

- 2) Volumen de H_2SO_4 0,02 N utilizado para la valoración de 10 g de polvo de vidrio: 0,15 ml.

Tipo de vidrio 1, según el método sobre fragmentos de la USP XXI.

- 3) Volumen de HCl 0,01 N utilizado para la valoración de 10 g de polvo de vidrio: 0,3 ml.

Tipo de vidrio 1, según el método sobre fragmentos de la Farmacopea Europea, 2ª edición.

- Tapón: Fabricante West Rubber España S.A.
Butilo Gris Formulación PH 21/50
Diseñado según se puede observar en la fig. nº 17 .
para poder ser cerrado al vacío o en atmósfera inerte en el interior de la cámara de liofilización. En el cuadro nº29, se hallan los resultados analíticos.

- Cápsula: Fabricante VIM S.A.
Aluminio desgarrable

Como disolvente de reconstitución de los viales se emplea agua bidestilada. Volumen de reconstitución 3,5 cc.

Los resultados analíticos son media de los resultados de analizar dos viales.

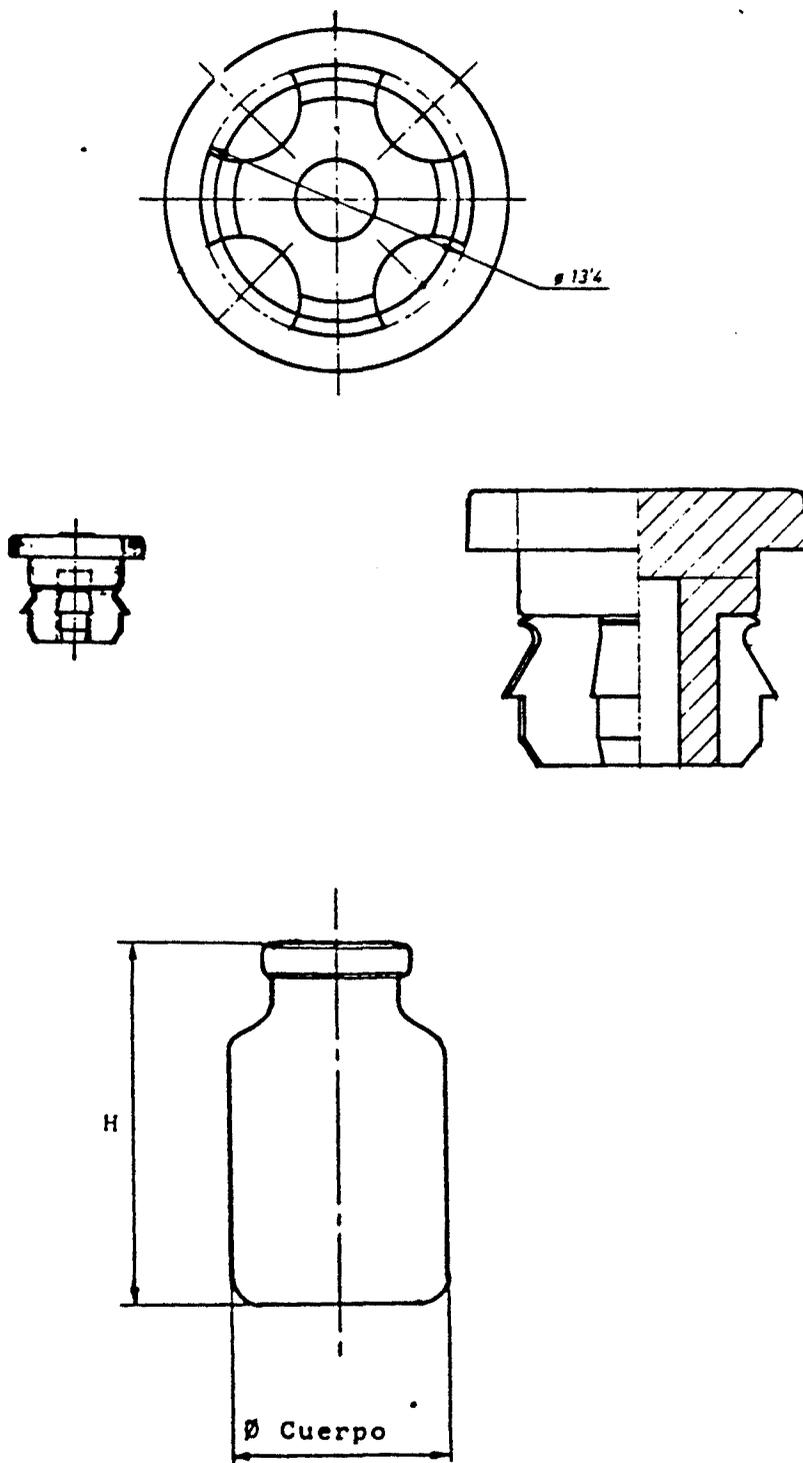


Figura nº 17: Croquis material de envasado.

Fórmula	pH	Temperatura de disolución °C	Concentración Amox. p/v, %.	Tiempo de disolución
A ₁	pH ₁	< 10	10	t ₁
A ₂	pH ₂	< 10	10	t ₂
A ₃	pH ₃	< 10	10	t ₃
A ₄	pH ₄	< 10	10	t ₄
B ₁	pH ₁	< 10-15	10	t ₅
B ₂	pH ₂	< 10-15	10	t ₆
B ₃	pH ₃	< 10-15	10	t ₇
B ₄	pH ₄	< 10-15	10	t ₈
C ₁	pH ₁	< 10	20	t ₉
C ₂	pH ₂	< 10	20	t ₁₀
C ₃	pH ₃	< 10	20	t ₁₁
C ₄	pH ₄	< 10	20	t ₁₂
D ₁	pH ₁	< 10-15	20	t ₁₃
D ₂	pH ₂	< 10-15	20	t ₁₄
D ₃	pH ₃	< 10-15	20	t ₁₅
D ₄	pH ₄	< 10-15	20	t ₁₆

Cuadro nº 27 .

19.2 Liofilización en disolución acuosa:

Las fórmulas estudiadas se hallan esquematizadas en el cuadro nº 27 .

El proceso de liofilización de cada lote, se ha realizado de acuerdo con los datos proporcionados por el Análisis Térmico Diferencial (ATD).

Las gráficas nº 38 a 46 inclusive , muestran los espectros U.V. y cromatogramas de alguno de los lotes.

19.2.1 Fórmula general de los lotes A y B:

Parámetros a controlar :

Concentración de amoxicilina trihidrato: 10% P/V

pH de la solución antes de liofilizar:

Temperatura de disolución:

Tiempo de disolución:

	<u>vial</u>	<u>10 viales</u>
Amoxicilina trihidrato	0,4025 g	4,025 g
NaOH 2 N	x ml	y ml
H ₂ O p.i. c.s.p.....	3,5 ml	35,0 ml

Técnica preparativa:

1. En un vaso de precipitados que se halla sumergido en un baño de hielo a 0°C, se disponen 2 ml de H₂O. Cuando esta se encuentra a una temperatura inferior a 10°C se suspende la amoxicilina bajo agitación magnética.
2. Con bureta verter lentamente gota a gota la solución de hidróxido sódico 2 N recién preparada, hasta disolución total de la amoxicilina trihidrato.
3. Ajustar el volumen final. Homogeneizar y anotar pH final.
4. Filtrar mediante jeringa provista con portafiltro SWINNEX y filtro MILLIPORE HAWPO1300 de 13 mm de diámetro y 0,45 µm.
5. Dosificar a 3,5 ml mediante jeringa Digital Variable Volume Dispenser Model 2100 NICHIRYO en los viales previamente lavados, siliconados y secados.
6. Se coloca el tapón de butilo en los viales, cargándose inmediatamente en las bandejas del liofilizador.
7. El proceso de liofilización de los lotes A y B se halla resumido en el cuadro nº 28:

FASE	TEMPERATURA °C	DURACION (h)	VACIO mm Hg
Congelación	- 25	3	-
deseccación primaria	regulado a 0°	50	10 ⁻²
deseccación secundaria	regulado a + 15°	12	10 ⁻²

Cuadro nº 28.

8. Una vez finalizado el proceso de liofilización, los viales se cierran al vacío en el interior de la cámara de liofilización mediante el dispositivo del que dispone el liofilizador que hemos empleado. Seguidamente los viales se encapsulan con capsulas de aluminio desgarrable mediante máquina encapsuladora Santiago Domenech.

Posteriormente, los viales son almacenados en congelador a -5°C hasta el momento de su análisis.

Los resultados experimentales de los lotes A y B se hallan recogidos en los cuadros nº 30, 31, 32 y 33 respectivamente.

CONTROL DE	TOLERANCIA (límite máximo)	RESULTADO
Sustancias reductoras	1,5 ml. 0,01 N KMnO_4 /10 ml.	0
Iones de metales pesados (incluyendo iones de Antimonio calculado como Pb^{+2}).	0,01 mg Pb^{+2} /10 ml.	0
Iones de Amonio	0,02 mg NH_4^{+2} /10 ml	0
Iones de cloruro	0,04 mg Cl^- /10ml	0
Alcalinidad o acidez	0,50 ml 0,005 N HCl & NaOH 0,005 N/10 ml	0,01 ClH
Sulfatos volátiles	Coloración del papel de Acetato de Plomo. 0,05 mg Na_2S /20 cm^2 Superficie de caucho	0
Iones de Zinc	0,03 mg/10 ml	0

Lote A

Fórmula	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Temp. disolución °C	8	9	8,5	8
pH disolución Antes liofilizar.	9,45	9,68	9,85	9,97
Consumo de NaOH 2N ml/vial	0,6	0,64	0,66	0,69
Tiempo de <u>di</u> solución (min)	11	10	11	11

—————→

Aumento de color disolución (ligeramente amarillento a amarillo).

Cuadro nº 30 .

Aumento de color producto liofilizado (BLANCO ROSA)



FORMULA	pH Después de liofilizar	HUMEDAD (K.F.)	S.A.I.	Espectrofotometría % Amox. Na P.S.	CLAR % Amoxi. Na P.S.
A ₁	9,44	1,0	5,70	90,08	90,59
A ₂	9,59	1,09	5,81	88,25	89,46
A ₃	9,83	1,06	6,20	87,68	86,53
A ₄	9,91	1,0	6,20	87,18	85,36

Cuadro nº 31.

Lote B

Fórmula	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄
Temp. disolución °C	11,5	13	12,5	13,5
pH disolución Antes liofili- zar.	9,49	9,67	9,90	10,0
Consumo de NaOH 2N ml/vial	0,6	0,64	0,68	0,7
Tiempo disolu- ción (min).	10,5	11	11	11


 Aumento color disolución
 ligeramente amarillento → amarillo

Cuadro nº 32.

Fórmula	pH Despues de liofilizar	HUMEDAD (K.F.)	S.A.I.	Espectrofotome- tría %Amoxi. Na p.s.	CLAR % Amox. Na p.s.
B ₁	9,46	1,10	5,84	89,38	89,27
B ₂	9,63	1,07	5,91	88,18	87,51
B ₃	9,81	1,05	6,50	85,07	83,15
B ₄	9,96	1,12	6,84	82,77	78,55

Cuadro nº 33.

19.2.2 Fórmula general de los lotes C y D:

Parámetros a controlar:

Concentración de amoxicilina trihidrato: 20 % P/V

pH de la solución antes de liofilizar:

Temperatura de la disolución:

Tiempo de disolución:

	<u>Vial</u>	<u>10 viales</u>
Amoxicilina trihidrato	0,805 g	8,05 g
NaOH 2N	e ml	d ml
H ₂ O p.i. c.s.p.	3,5 ml	35,0 ml

La técnica preparatoria es la misma que para los lotes A y B.

El proceso de liofilización de los lotes C y D, se halla resumido en el cuadro nº 34 .

Los resultados experimentales de los lotes C y D, se hallan recogidos en los cuadros nº 35,36,37 y 38.

FASE	TEMPERATURA °C	DURACION (h)	VACIO mm Hg
Congelación	- 30°	5	-
Dsecación primaria	regulado a 0°C	50	10 ⁻²
Dsecación secundaria	regulado a +15°	16	10 ⁻²

Cuadro n° 34.

Lote C

Fórmula	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
Temp. disolución °C	9	8	9	9
pH disolución Antes liofilizar.	9,46	9,74	9,87	10,0
Consumo de NaOH 2N ml/vial	1,19	1,24	1,28	1,3
Tiempo de disolución min	16	16	17	17



aumento color disolución
 aumento intensidad coloración amarilla

Cuadro nº 35.

Fórmula	pH Despues de liofilizar	HUMEDAD	S.A.I.	Espectrofotometría %Amoxi. Na p.s.	CLAR % Amox. Na p.s.
C ₁	9,43	1,33	6,20	85,95	83,08
C ₂	9,70	1,37	6,31	84,55	82,99
C ₃	9,83	1,37	6,40	84,01	82,69
C ₄	9,95	1,24	6,37	83,9	80,89

Cuadro nº 36.

Lote D

Fórmula	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Temp. disolución °C	14	14	12,5	11
pH disolución antes liofili- zar	9,45	9,70	9,90	10,0
Consumo de NaOH 2N ml/vial	1,2	1,25	1,27	1,3
Tiempo disolución (min)	16	16	15,5	17


 aumento color disolución
 aumento intensidad coloración amarilla

Cuadro nº 37.

Fórmula	pH Después de liofilizar	HUMEDAD	S.A.I.	Espectrofotometría % Amoxi.Na p.s.	CLAR % Amoxi.Na p.s.
D ₁	9,42	1,27	6,50	86,62	83,37
D ₂	9,66	1,30	6,56	82,70	81,25
D ₃	9,78	1,28	6,72	79,52	80,41
D ₄	9,86	1,34	6,85	77,43	78,66

Cuadro nº 38 .