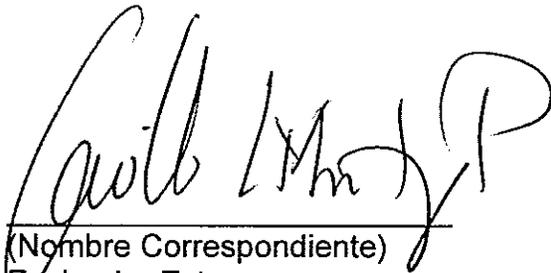
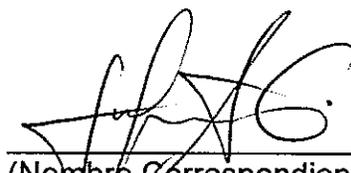


**APROBADO POR:**

  
\_\_\_\_\_  
(Nombre Correspondiente)  
Evaluador Externo.

  
\_\_\_\_\_  
(Nombre Correspondiente)  
Evaluador Externo.

  
\_\_\_\_\_  
(Nombre Correspondiente)  
Director del Proyecto.

\_\_\_\_\_  
(Nombre Correspondiente)  
Director ó Co-Director del Proyecto.



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE AMPICILINA EN UNA MATRIZ BIOLÓGICA OBTENIDA EN ENSAYOS DE PERMEABILIDAD *IN VITRO*.**

**PROYECTO DE GRADO**

**CAROLINA SÁNCHEZ ARARAT**

**DIRECTOR  
JULIÁN ARBEY GONZALEZ, M.Sc.**

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

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR UPLC  
PARA LA DETERMINACIÓN DE AMPICILINA EN UNA MATRIZ BIOLÓGICA  
OBTENIDA EN ENSAYOS DE PERMEABILIDAD *IN VITRO*.**

**CAROLINA SÁNCHEZ ARARAT**

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al director Julián Arbey González por su orientación y apoyo durante la ejecución del proyecto de grado.

Al grupo de investigación en Bio-farmacia y Bio-cosmética por su acompañamiento y colaboración en la realización del proyecto de grado.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Naturales que contribuyeron en mi formación como profesional integral.

A la Universidad Icesi, por brindarme durante cinco años una educación de alta calidad y colocar a mi disposición las herramientas necesarias para llevar a cabo el presente proyecto de grado.

## CONTENIDO

1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
4. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO.....	11-20
4.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	11
4.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	12-20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6. METODOLOGÍA.....	22-27
6.1. MATERIALES.....	22
6.2. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	23
6.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	24-27
6.4. MATRIZ DE MARCO LÓGICO.....	28-30
7. IMPACTO AMBIENTAL.....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32-69
8.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	32-41
8.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	41-66
8.3. APLICACIÓN DEL METODO ANALÍTICO.....	66-69
9. CONCLUSIONES.....	70
10. RECOMENDACIONES.....	71

11. BIBLIOGRAFIA.....72-74

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de ampicilina .....	13
Figura 2. Mecanismo de acción de antibióticos betalactámicos .....	14
Figura 3. Estructura química de metoprolol .....	16
Figura 4. Tecnología Bridged Ethyl Hybrid (BEH) .....	17
Figura 5. Mecanismo de degradación de penicilinas.....	62

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de estándares de calibración .....	26
Tabla 2. Preparación de muestras de precisión y exactitud.....	27
Tabla 3. Gradiente de elución de método analítico No. 1 .....	34
Tabla 4. Gradiente de elución de método analítico No.2.....	40
Tabla 5. Condiciones instrumentales de método analítico final.....	42
Tabla 6. Gradiente de elución del método analítico final.....	42
Tabla 7. Resultados Linealidad .....	45-46
Tabla 8. Comparación de modelos alternos para ampicilina .....	47
Tabla 9. Residuos atípicos para curva de calibración de ampicilina .....	49
Tabla 10. Residuos atípicos para curva de calibración de metoprolol .....	52
Tabla 11. Comparación de modelos alternos para metoprolol .....	53
Tablas 12 y 13. Resultados precisión y exactitud (Día 1).....	56
Tablas 14 y 15. Resultados precisión y exactitud (Día 2).....	57
Tablas 16 y 17. Resultados precisión y exactitud (Día 3).....	58
Tablas 18. Resultados precisión y exactitud inter-día para ampicilina .....	59
Tablas 19. Resultados precisión y exactitud inter-día para metoprolol.....	59
Tablas 20. Resultados de estabilidad a corto plazo para ampicilina .....	63
Tablas 21. Resultados de estabilidad a corto plazo para metoprolol .....	63
Tablas 22. Resultados de estabilidad post preparativa para ampicilina .....	65
Tablas 23. Resultados de estabilidad post preparativa para metoprolol .....	66
Tablas 24. Resultados de estabilidad a largo plazo para ampicilina y metoprolol ..	68

## 1. RESUMEN

Debido a que en Colombia no se ha reportado la utilización de modelos de permeabilidad *in vitro* como herramienta para predecir la biodisponibilidad oral de principios activos nuevos o existentes, tampoco se ha impulsado el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su cuantificación en matrices biológicas complejas provenientes de dichos modelos.

Lo anterior refleja una problemática, pues el no disponer de estas metodologías dificulta el conocimiento de la farmacocinética y limita la aplicabilidad de estrategias farmacéuticas orientadas a mejorar la biodisponibilidad de activos que presentan problemas de absorción como es el caso de los antibióticos betalactámicos.

En el presente proyecto, se desarrolló una metodología analítica rápida y sencilla empleando Cromatografía Líquida de Ultra Eficiencia (UPLC) para cuantificar la fracción de ampicilina permeada en células epiteliales intestinales Caco-2, con el objetivo de predecir la absorción *in vivo* de la misma. Adicionalmente, la metodología analítica se validó siguiendo las pautas establecidas por la United States Pharmacopeia en la Validación de Métodos Compendiales y por la Food and Drug Administration en la Guía para Validación de Métodos Bioanalíticos, encontrándose que cumple con parámetros de desempeño como selectividad, precisión, exactitud y linealidad.

Posteriormente, se aplicó la metodología validada al análisis de 300 muestras obtenidas en ensayos de permeabilidad *in vitro* (realizados en la Universidad Icesi), comprobándose que el método analítico se encuentra en capacidad de identificar y cuantificar el activo ampicilina en matrices biológicas y que por tanto, cumple con el fin para el que se diseñó.

**Palabras Clave:** ampicilina; metodología analítica, UPLC; permeabilidad *in vitro*; validación.

## 2. ABSTRACT

Due to in Colombia has not been reported models of permeability *in vitro* as a tool for predicting the oral bioavailability of new or existing active substances, nor has driven the development of analytical methodologies to quantify them in complex biological matrices from these models.

This reflects a problematic; not having these methodologies hinders the knowledge of pharmacokinetics and limits the applicability of pharmaceutical strategies to improve bioavailability of substances that have absorption problems such as the beta-lactam antibiotics.

In this project, a quick and simple analytical method was developed using Efficiency Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) to quantify the fraction permeated ampicillin in Caco-2 intestinal epithelial cells , in order to predict *in vivo* absorption. Additionally, the analytical methodology was validated following the guidelines established by the United States Pharmacopeia in the Validation of compendial methods and by the Food and Drug Administration in the Guide for Validation of Bioanalytical Methods, finding that it meets parameters of performance such as selectivity, precision, accuracy and linearity.

Following this, the validated method was applied to the analysis of 300 samples obtained from *in vitro* permeability assays (performed in Icesi University), confirming that the analytical method is able to identify and quantify ampicillin in biological matrices and therefore fulfills the purpose for which it was designed.

**Keywords:** ampicillin, analytical methodology, UPLC, permeability *in vitro*; validation.

## 2. INTRODUCCIÓN

La ampicilina es una de las penicilinas semisintéticas más prescritas en el tratamiento de infecciones bacterianas gracias a su amplio espectro de actividad frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. Sin embargo en los últimos años, su eficacia se ha limitado debido a que posee pobre absorción a nivel intestinal (35-50% de la dosis), y ello se convierte en determinante de su eficacia y conduce a la aparición progresiva de resistencia bacteriana (Suarez, 2009). A causa de lo anterior, se ha optado por asociar este antibiótico con matrices poliméricas derivadas del anhídrido del ácido maleico, como son las sales potásicas y sódicas de Poli (ácido maléico-alt-octadeceno), las cuales pueden actuar modificando sus propiedades farmacocinéticas y así mejorar su biodisponibilidad (Salamanca, 2005).

Para evaluar el efecto de sistemas poliméricos sobre el proceso de absorción intestinal se requiere realizar ensayos de permeabilidad *in vitro* con modelos biológicos que presenten gran similitud con las células epiteliales intestinales, como son las células de carcinoma de colón humano (Caco2) y posteriormente, desarrollar una metodología analítica que permita cuantificar la fracción de ampicilina permeada en dichas células, cuando el antibiótico se encuentra en presencia y ausencia de los sistemas poliméricos.

El presente proyecto, se enfocó en desarrollar y validar una metodología de análisis usando la técnica de Cromatografía de Ultra Alta Eficiencia (UPLC), la cual permitió identificar y cuantificar el antibiótico ampicilina en un rango de concentración de 0,5 a 50  $\mu\text{M}$  y en un tiempo de análisis de 4 minutos, asegurando a su vez el cumplimiento de características como selectividad, exactitud, precisión y linealidad.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La ampicilina es un antibiótico betalactámico de amplio espectro, usado extensamente en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas en humanos y animales, sin embargo, se ha reportado que presenta una baja biodisponibilidad oral (35- 50%) y que existe una alta variabilidad entre individuos en relación a éste parámetro, lo que conduce a la aparición de microorganismos resistentes al antibiótico y a consecuentes implicaciones ambientales y de salud (Lafforgue, 2008).

La baja biodisponibilidad de ampicilina se relaciona principalmente con sus propiedades hidrofílicas y la dificultad de permear las membranas celulares. Por lo anterior, se han diseñado estrategias farmacéuticas que permitan mejorar esa problemática, como son el uso de sistemas poliméricos derivados del anhídrido del ácido maleico, los cuales al actuar como sistemas formadores de micelas, solubilizan el fármaco en su interior y posteriormente lo liberan por un equilibrio termodinámico con el medio o por un cambio drástico en las condiciones externas (Salamanca, 2005).

No obstante, se requiere disponer de una metodología que permita corroborar si la asociación de ampicilina con los sistemas poliméricos refleja o no un incremento en la biodisponibilidad. Este tipo de metodologías- aún poco implementadas en Colombia- abarcan la realización de una serie de ensayos de permeabilidad in vitro y posteriormente, la utilización de una técnica analítica como es la cromatografía líquida para lograr la cuantificación del antibiótico en las matrices biológicas obtenidas de dichos ensayos (Castillo, 2006).

#### 4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Los antibióticos betalactámicos constituyen la familia más numerosa de antibióticos y la más utilizada en la práctica clínica. Se definen químicamente por la presencia de un anillo betalactámico, el cual determina su mecanismo de acción (inhibición de la síntesis de la pared celular), escasa toxicidad y principal mecanismo de resistencia (betalactamasas). A este anillo betalactámico se unen otros anillos y diferentes tipos de cadenas lineales que modifican las propiedades del compuesto resultante y originan diferentes grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las betalactamasas (Marín, Gudiol, 2002).

Las penicilinas presentan un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico (de cinco componentes) al que se asocia una cadena lateral con diversidad de sustituyentes. El tipo de sustituyente(s) marca la diferencia en cuanto actividad antibacteriana y propiedades farmacocinéticas, dando lugar a distintos tipos de penicilinas: penicilinas naturales (penicilina G y V), penicilinas betalactamasa resistentes (oxacilina, dicloxacilina), penicilinas de amplio espectro, como las aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina) y de muy amplio espectro (carbenicilina, ticarcilina, ureidopenicilinas) (Lorenzo et al., 2008).

La ampicilina es un antibiótico betalactámico perteneciente al grupo de las penicilinas, usado desde el año 1961 en el tratamiento de infecciones bacterianas. Se describe químicamente como (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-fenilacetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-ácido carboxílico; es un polvo cristalino blanco, prácticamente inodoro, ligeramente soluble en agua e insoluble en éter y cloroformo (Gennaro, 2000). Se presenta como trihidrato, siendo su peso molecular 403.45 g/mol;  $pK_{a1} = 2.5$  y  $pK_{a2} = 7.5$  (Aki et al., 2009);  $\log P = 1.0$  (Neubert, 1989); fórmula molecular  $C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$  y fórmula estructural:

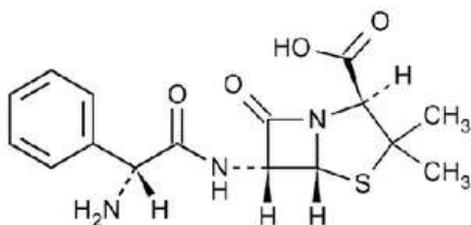


Figura.1. Estructura química de ampicilina (Gennaro, 2000).

La ampicilina (como sal sódica) es un polvo cristalino blanco, higroscópico, muy soluble en agua, con peso molecular de 371.39 g y fórmula molecular

$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$ , utilizado para inyección por vía intramuscular o intravenosa (Gennaro, 2000).

La ampicilina es una de las penicilinas semisintéticas más prescritas en el tratamiento de infecciones bacterianas, debido a su actividad frente a microorganismos gram positivos y gram negativos, en los cuales es capaz de penetrar y destruir gracias a que posee un grupo amino en su estructura (Ashnagar, Gharib, 2007). De esta forma, ampicilina es útil en el tratamiento de infecciones causadas por estreptococo, neumococo, enterococo, *E. Coli*, *H. Influenzae*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, etc., pero ineficaz contra microorganismos productores de penicilinas (Gamba, Dusi, 2002).

Es un agente bactericida que produce su efecto a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La pared celular bacteriana es una estructura que envuelve las bacterias de todos los géneros (excepto micoplasmas), se sitúa por fuera de la membrana citoplasmática y está compuesta principalmente de peptidoglucano. El peptidoglucano está constituido por cadenas largas de glúcidos (formadas por moléculas de ácido N- acetilmurámico y N- acetilglucosamina), estos componentes son sintetizados en el citoplasma y transportados al espacio periplásmico donde se requiere la acción de unas proteínas con actividad enzimática llamadas transpeptidasas o PBP (penicillin binding protein), que son las encargadas de formar tetrapéptidos a partir de pentapeptidos y así finalmente formar el peptidoglucano. (Suarez, Gudiol, 2009).

Los betalactámicos son capaces de interrumpir la síntesis de la pared celular, al inhibir la transpeptidación. El anillo betalactámico presenta similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen dichas enzimas y es capaz de unirse a ellas de forma covalente, impidiendo la formación de la pared celular y dejando la bacteria expuesta al medio, la cual muere debido a cambios en la presión osmótica. También, los betalactámicos actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano (Suarez, Gudiol, 2009) .Ver Fig.2.

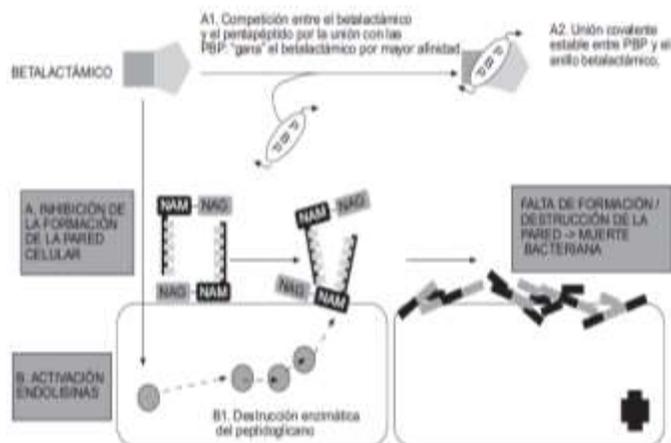


Figura.2. Mecanismo de acción de betalactámicos (Suarez, 2008).

La ampicilina puede administrarse vía oral (como trihidrato) o vía parenteral (como sal sódica). Es estable en medio ácido, su absorción vía oral es del 35-50% y disminuye con la ingesta de alimentos. La concentración plasmática máxima se alcanza 1 a 2 horas después de la administración y la vida media en sujetos con función renal normal es de aproximadamente 1 hora. Se une a proteínas plasmáticas en un 20% y la distribución corporal es amplia. Su metabolismo es casi nulo, solo el 10% del fármaco es metabolizado en el hígado (a ácido penicínico) y el resto permanece en forma activa hasta su eliminación, siendo principalmente vía renal (70%) y vía biliar (<5%). Atraviesa la placenta y se excreta en la leche materna (aunque en concentración baja). (Ausina, Moreno, 2005).

A pesar del uso extenso del antibiótico en el tratamiento humano y animal, la ampicilina por su carácter hidrofílico presenta pobre absorción a nivel intestinal, lo que lleva a que la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica y está disponible para ejercer un efecto farmacológico no sea mayor al 40%. Así, la baja biodisponibilidad junto con la alta variabilidad interindividual en éste parámetro conducen a la aparición de microorganismos resistentes al antibiótico y a la generación de consecuentes implicaciones en la salud y en el ambiente (Lafforgue, 2008).

Con la finalidad de proveer una solución a la problemática planteada, actualmente se estudian polímeros derivados del anhídrido del ácido maleico, como las sales potásicas y sódicas de Poli (ácido maleico-alt-octadeceno) denominadas PAM-18 K y PAM-18 NA, que al actuar como sistemas formadores de micelas pueden solubilizar el fármaco dentro de éstas y posteriormente liberarlo por un equilibrio termodinámico con el medio o por un cambio drástico en las condiciones externas (Salamanca, 2005). Así, estos polímeros podrían convertirse en potenciales sistemas de liberación modificada en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos resistentes a dichos antibióticos.

Bajo lo anterior, se manifiesta la necesidad de realizar ensayos de permeabilidad *in vitro* usando monocapas celulares como las Caco-2 (células de carcinoma de colon humano) que por presentar gran similitud con las células epiteliales intestinales, puedan ayudar a predecir la absorción *in vivo* de la ampicilina cuando se encuentra asociada y no a sistemas poliméricos. Es relevante mencionar que en éste tipo de ensayos siempre se utiliza un fármaco patrón o referente de permeabilidad y el metoprolol ha sido internacionalmente adoptado para ese fin (Oltra, 2010).

El metoprolol es un antagonista  $\beta$ -adrenérgico usado como fármaco antihipertensivo, antianginoso y antiarrítmico (Yoon et al., 2010), que se describe químicamente como 1-[4-(2-methoxyethyl) phenoxy]-3-(propan-2-ylamino) propan-2-ol. Es una molécula de carácter básico, que se presenta como un polvo cristalino blanco, inodoro y muy hidrosoluble (Oltra, 2010). Su peso molecular es de 267,364g/mol; pKa=9,7 (Regardh, 1980); log P=1.88 (Forbes et al., 2003); fórmula molecular  $C_{15}H_{25}NO_3$  y fórmula estructural:

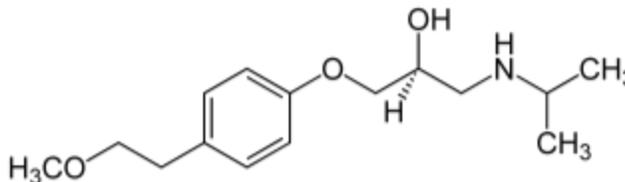


Figura.3. Estructura química de Metoprolol (Gennaro, 2000)

Una vez se han concluido los ensayos de permeabilidad *in vitro*, se requiere contar con un método analítico que permita cuantificar la fracción permeada de ampicilina y del fármaco patrón. Es así, como en éste proyecto se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de ampicilina y metoprolol, por cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC), en una matriz compleja obtenida en ensayos de permeabilidad *in vitro* con la línea celular Caco-2 y compuesta principalmente por la solución Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) y HEPES 25 mM.

La solución HBSS, compuesta por cloruro de calcio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de sodio, fosfato dibásico de sodio y D-glucosa, permite mantener el pH y el balance osmótico así como proveer agua e iones inorgánicos esenciales a las células. La solución HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico) se usa en concentraciones de 10 mM a 25 mM, como suplemento de la solución HBSS, ayudando a mantener el pH de los cultivos celulares incluso cuando éstos requieran extensos periodos de manipulación por fuera de la incubadora de dióxido de carbono. (Información obtenida del proveedor Lonza®)

La cromatografía líquida es una técnica analítica de separación ampliamente utilizada gracias a sus características de sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas y aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia como los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, fármacos, antibióticos, especies inorgánicas, etc. La cromatografía líquida convencional se llevaba a cabo en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm y con un diámetro de partícula de fase estacionaria de 150 a 200  $\mu\text{m}$ , no obstante los tiempos de separación eran largos y a menudo alcanzaban varias horas. A finales de los años noventa, se encontró que era posible aumentar la eficacia de la columna al disminuir el tamaño de las partículas de relleno y así se desarrolló la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) donde se emplearon rellenos de tamaño de partícula de 3 a 10  $\mu\text{m}$  y se requirió instrumentación sofisticada para trabajar a altas presiones, por encima de 6000 psi. (Skoog et al., 2005).

Actualmente, se dispone de una técnica mejorada de HPLC, la UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) que conserva los principios de la misma, pero que se caracteriza por su química de partículas con diámetro menor a 2  $\mu\text{m}$  y, por operar a presiones de hasta 15.000 psi (Armenta et al., 2008), lo que permite reducciones significativas en los tiempos de análisis y en el consumo de solventes así, como incrementos en la velocidad, sensibilidad y resolución (Tawakkul, et al. 2010) (Swartz, 2005).

La corporación Waters® fue quién introdujo la tecnología UPLC con su sistema ACQUITY UPLC, el cual se compone de un módulo de gestión de solventes cuaternario (QSM); sistema de gestión de muestras con flujo través de la aguja (SM-FTN); compartimiento para columnas con manejo de temperaturas en el rango de 4-90°C y un detector (PDA, ELSD, etc.).

El diseño de las columnas empleadas en UPLC se basa en el empaquetamiento con partículas híbridas de 1.7 $\mu\text{m}$ , entre las que se encuentran las columnas BEH (Bridged Ethyl Hybrid) que fueron creadas a partir de tetraetoxi-silano y Bis (trietoxisilil)-etano y se caracterizan por su excepcional estabilidad en un amplio rango de pH y resistencia mecánica frente a altas presiones (Montoya, 2012). Otra generación de columnas, son las CSH (Charged Surface Hybrid) cuyas partículas se basan en la tecnología BEH y además incorporan un bajo nivel de carga superficial, lo que incrementa la capacidad de carga de la muestra y mejora la asimetría de los picos cromatográficos en fases móviles con baja fuerza iónica pero manteniendo siempre la estabilidad mecánica y química inherente de la tecnología BEH.

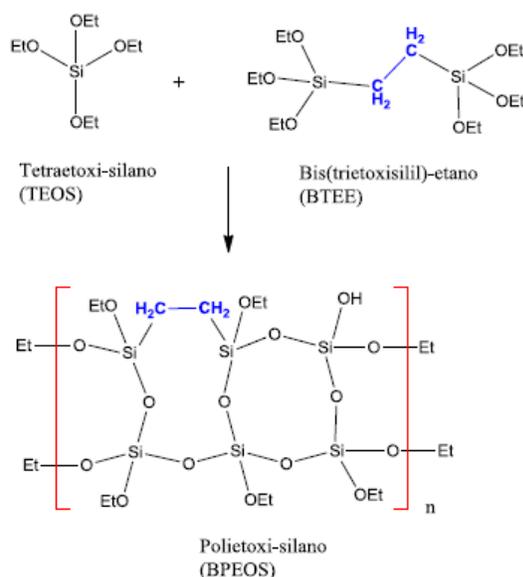


Figura.4. Tecnología BEH. Tomado de <http://www.waters.com>.

Entidades internacionales como la Food and Drug Administration (FDA) y la International Conference on Harmonisation (ICH) recomiendan que los métodos analíticos deben ser sometidos a validación, con el objetivo de demostrar que los datos obtenidos con dichos métodos son aceptables para el fin que se pretende (Sierra et al., 2010).

Según la USP 31- NF 26, (Capítulo 1225 -Validación de métodos compendiales), la validación de un método analítico se define como el procedimiento por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones de análisis previstas. Además establece que los parámetros analíticos que deben ser considerados en la validación son los siguientes: exactitud, precisión, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez.

No obstante, considerando que el método a desarrollar es un método bioanalítico, se deben seguir los lineamientos expuestos en la Guía para Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA, en la cual se mencionan que los parámetros a validar son: selectividad; precisión, exactitud y recuperación, linealidad y estabilidad.

La selectividad es la capacidad del método analítico de diferenciar y cuantificar los analitos en presencia de otros componentes en la muestra (impurezas, metabolitos, productos de degradación y componentes endógenos de la matriz biológica).

La precisión describe la cercanía o grado de dispersión entre una serie de medidas obtenidas de repeticiones de una muestra bajo las condiciones de análisis establecidas. Por su parte, la exactitud describe el grado de dispersión de un valor obtenido respecto al valor nominal o conocido bajo las condiciones de análisis establecidas.

La linealidad se describe como la capacidad para producir resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en las muestras, dentro de un rango dado. Para definir el rango de concentración en el que el método analítico exhibe un comportamiento lineal debe determinarse de antemano el Límite de Cuantificación y el Límite de Detección. El primero hace referencia a la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada con una precisión y exactitud adecuada; el segundo se refiere a la concentración mínima de analito que puede diferenciarse con fiabilidad de la señal del blanco o del ruido de fondo (ICH,2005) .

La estabilidad de los analitos en una matriz biológica está en función de las condiciones de almacenamiento, por lo que éstos deben someterse a diferentes ambientes y periodos de tiempo para evaluar el mantenimiento de sus propiedades químicas. De esta forma, la estabilidad de los analitos deberá ser evaluada durante la manipulación de las muestras, a corto plazo (a temperatura ambiente), a largo plazo (congeladas a una temperatura de almacenamiento prevista) y después de realizar ciclos de congelación y descongelación (FDA, 2001).

A la actualidad, existen pocas publicaciones que reporten el desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de principios activos en matrices provenientes de ensayos de permeabilidad *in vitro*. No obstante, se han reportado diversos trabajos en los que se ha cuantificado ampicilina y metoprolol mediante HPLC y, los cuales se tomarán como referencia para orientar el presente proyecto.

En el año 2005, miembros de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Tokio, desarrollaron una metodología analítica empleando HPLC (High performance Liquid Chromatography) para determinar simultáneamente lenampicilina (profármaco de ampicilina), ampicilina y antipirina (referente de permeabilidad) en muestras obtenidas en ensayos de permeabilidad *in vitro* con células Caco-2. Las condiciones instrumentales empleadas fueron: fase móvil consistente en un 37% de metanol y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM en agua (pH 4.5); velocidad de flujo de 1.5 mL/ min; columna Octil-80Ts (4.6mm  $\times$  150mm); tiempo de retención de ampicilina 2.50 y tiempo de retención de lenampicilina 9.95; tiempo de corrido de 10 minutos y detección UV a 200 nm. Al determinarse la linealidad del método en el rango de concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  a 0.5 mM, se encontró un coeficiente de correlación de 0.9994 con una S.D. de 0,0001 para lenampicilina y de 0.9999 con una S.D. de 0,0004 para ampicilina. Bajo lo anterior, se concluyo que el método analítico

desarrollado fue apropiado para determinar los dos activos de interés (Mizuma, et al., 2005).

El artículo mencionado anteriormente, se basó en uno publicado en el año 1990, donde igualmente se cuantificó ampicilina y lenampicilina por HPLC en matrices biológicas obtenidas de ensayos de permeabilidad *in vitro* con células Caco-2; la única diferencia radicó en la composición de la fase móvil, donde se cambió el acetonitrilo por metanol con el fin de minimizar costos. No obstante, logró corroborarse que la combinación del metanol y la columna C<sub>8</sub>, hizo posible mantener el tiempo de corrido en 10 minutos (Marzo et al., 1990).

En un trabajo realizado en el año 2002, se cuantificó ampicilina en fluidos biológicos (suero, saliva y jugo gástrico) empleando el equipo HPLC Shimadzu, columna Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm) y detector UV configurado a 214 nm. La fase móvil consistió en una mezcla de 0.05 M de buffer fosfato de potasio a pH 4.5 y metanol (18:22 v/v) con un flujo de 1.6 ml/min. Bajo estas condiciones, se obtuvo una curva de calibración en el rango de 10.0-60.0 µg/ml, observándose una relación lineal entre la altura del pico y la concentración de ampicilina y, un coeficiente de correlación de 0.997. El coeficiente de variación intra ensayo obtenido fue menor del 5% y la concentración de ampicilina se determinó por el método cuantitativo de estándar interno (3- nitroanilina) (Ortiz, et al., 2002).

En otro estudio donde se correlacionó la permeación *in vitro* de varios antibióticos betalactámicos, con la biodisponibilidad oral en humanos; se empleó para la identificación y cuantificación de los mismos, un equipo HPLC Shimadzu, columna Waters C<sub>18</sub> (150 mm × 3.9 mm, 5 µm), longitud de onda de 215 nm y fase móvil compuesta por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y metanol (8:2) con un flujo de 0.6-1 ml/min. Con este método, se obtuvo una relación lineal entre la altura del pico y las concentraciones de ampicilina, en el rango de 0-10µM. El coeficiente de variación obtenido fue menor al 6% en los inter e intra ensayos realizados y la precisión fue del 98% (Saitoh et al., 2002).

Con referencia al metoprolol, en el 2008, se desarrollo y valido un método analítico por HPLC para el análisis rutinario del metoprolol tartrato en tabletas. Se uso una columna de fase reversa C<sub>18</sub>, fase móvil compuesta por metanol y agua (95:5) a un flujo de 1.2 ml/min y detección UV a 225 nm. El tiempo de corrido fue de 10 min y el tiempo de retención de metoprolol fue de 7.98 min. El método analítico se valido acorde a las Guías de la Conferencia Internacional de Armonización, encontrándose que el método fue específico porque no se observaron picos interferentes durante el tiempo de corrido; lineal dentro del rango de concentración de 5-50 µg/ml, con un coeficiente de correlación de 0.99907 y preciso dado que la desviación estándar relativa fue menor al 2% (Garg et al., 2008).

En un estudio realizado sobre la farmacocinética del metoprolol tartrato, se empleó HPLC para la cuantificación del activo en muestras de plasma y orina, usando columna de fase reversa C<sub>18</sub>, fase móvil compuesta por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM a pH 4.5 en proporción de 85:15 (v/v) a un flujo de 1.5ml/min y detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 272 nm y de emisión de 303 nm. El tiempo de retención del metoprolol fue de 12 min y de 5 min para el estándar interno (catequina) (Yoon, et al, 2010).

Finalmente, en un artículo publicado en el año 2013, en el que se desarrollo y valido un método analítico por HPLC para la determinación de metoprolol. En este se empleó un cromatografo Shimadzu equipado con una columna Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm). Las condiciones cromatográficas fueron: elución isocrática con fase móvil compuesta por acetonitrilo/buffer fosfato (35:65 v/v); flujo de fase móvil de 1,5 ml/min y detección UV a 226 nm (Pencheva, et al., 2013).

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y validar una metodología analítica para cuantificar la fracción de ampicilina sódica permeada en las células Caco- 2, con el fin de conocer el efecto de la matriz polimérica PAM- 18Na en el proceso de absorción intestinal.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Crear un método instrumental que permita la identificación y cuantificación de ampicilina sódica en una matriz biológica proveniente de ensayos de permeabilidad *in vitro*, mediante la técnica UPLC.
- Seguir los lineamientos establecidos por la FDA para la validación de métodos bioanalíticos.
- Aplicar la metodología analítica validada, al análisis de una serie de muestras obtenidas en ensayos de permeabilidad *in vitro* con células Caco-2.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. MATERIALES**

#### **6.1.1. Reactivos**

- Ampicilina sódica. Estándar secundario, proporcionado por Tecnoquímicas S.A.
- (±)-Metoprolol (+) - tartrate salt, minimum 99%. Fabricante: SIGMA ALDRICH®. Lote No. 018K0760.
- Poli (ácido-maleico-alt-octadeceno).Fabricante: SIGMA ALDRICH®.
- Hank´s Balanced Salt Solution. Marca: Lonza. Lote No. 0000325383.
- Medio HEPES 25 mM, proporcionado por CIDEIM
- Acetonitrilo grado HPLC, Fabricante: Merck®.
- Fosfato de sodio monobásico (Cantidad dispensada por la Universidad Icesi).
- Agua tipo I.

#### **6.1.2. Equipos y materiales**

- Equipo UPLC ACQUITY H-CLASS- Waters®
- Columna ACQUITY CSH C18- Waters®
- Precolumna VanGuard- Waters®
- Balanza RADWAG
- pH metro SCHOTT
- Sistema de filtración de solventes SCHOTT
- Baño ultrasonido Elmasonic E120H
- Congelador Mabe
- Micropipetas Gilson de 2-20µL, 20-200µL y 100 a 1000µL
- Membranas de filtración 0.45 µm Gridded MCE, sterile
- Viales ámbar Agilent de 1.5 mL
- Filtros Millipore de 0.22µm
- Jeringas de 3 ml Rymco.

## 6.2. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para llevar a cabo el desarrollo del método analítico, primero se realizó un cuadro comparativo con los métodos analíticos publicados (hasta el momento) para la cuantificación de ampicilina y metoprolol por HPLC, con el fin de seleccionar las condiciones instrumentales que permitieran la identificación simultánea de los activos de interés.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las propiedades fisicoquímicas de los activos, como son el coeficiente de partición, pKa, etc., con el fin de proponer métodos coherentes y acordes a las necesidades del proyecto.

Con base en lo anterior, se colocaron a prueba distintos métodos instrumentales y de acuerdo a los resultados obtenidos se fueron realizando modificaciones o ajustes en la composición de la fase móvil, temperatura de la columna, tiempos de análisis, etc., hasta llegar al método analítico final, que consistió en un método de elución por gradiente, con fase móvil compuesta por buffer fosfato de sodio monobásico pH 4,5 y acetonitrilo y tiempo de análisis de 4 min. Cada uno de los métodos instrumentales desarrollados se describe en detalle en la sesión de resultados y discusión.

Cabe mencionar que una vez se proponía un método analítico, se alistaban y preparaba (al uso) la fase móvil así como los estándares y muestras. En el equipo UPLC, se cambiaba la fase móvil y purgaban los canales dispuestos para la misma, se instalaba la columna y se disponían las muestras en el automuestreador. Posteriormente, se acondicionaba el equipo, incrementando poco a poco el flujo de la fase móvil hasta alcanzar el flujo deseado (0,5ml/min) y se dejaba estabilizar el equipo por aproximadamente 10 min hasta observar una línea base constante. A continuación, se seleccionaba el método instrumental y se realizaban inyecciones de prueba antes de analizar los estándares o muestras preparadas. Al finalizar los análisis, siempre se realizaba un lavado de la columna (debido a la presencia de sales en la misma), siguiendo el esquema u orden:

- Cambio de buffer pH 4.5 por agua
- Purga del canal que dispensaba el buffer pH 4.5
- Flujo por 5 min de agua-ACN 80:20
- Flujo por 5 min de agua-ACN 50:50
- Flujo por 5 min de agua-ACN 20:80

## 6.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Los parámetros de validación se determinaron siguiendo los lineamientos de la FDA para Validación de Métodos Bioanalíticos:

### 6.2.1. Selectividad

Bajo las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 1, se analizaron 6 muestras independientes de la matriz compuesta por HBSS HEPES y PAM-18 Na a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ . La concentración empleada de PAM-18 Na corresponde a la que se dispuso en el lado apical de las monocapas celulares.

- ✓ Preparación de la matriz HBSS HEPES con PAM-18 Na 1000  $\mu\text{M}$ .

Se pesaron 19,900 mg de PAM-18 Na y se llevaron a volumen con HBSS HEPES 25 mM en un matraz aforado de 50 mL. Posteriormente, se sometió a ultrasonido por 30 minutos (con el fin de solubilizar al máximo PAM-18 Na), se adicionó 1 ml de la matriz a cada vial y se filtró por membrana de 0,22 $\mu\text{M}$ .

### 6.2.2. Límite de Detección y Cuantificación

Se prepararon y analizaron por triplicado estándares de ampicilina sódica y metoprolol tartrato a concentraciones de 5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  y 0,2  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, se revisaron los cromatogramas obtenidos y se identificó hasta que concentración era posible visualizar el pico correspondiente a cada analito.

Seguidamente, se eligieron las tres concentraciones (más bajas) donde se observaban los picos y se graficaron las áreas promedio de cada analito versus las concentraciones, y las desviaciones estándar versus las concentraciones. Con base en la información de los gráficos (pendiente e intercepto) se emplearon fórmulas que han sido reportadas en diversos artículos para predecir el límite de detección y cuantificación.

### 6.2.3. Linealidad

Para los analitos, ampicilina sódica y metoprolol tartrato, se elaboró una curva de calibración compuesta por un blanco (HBSS HEPES con PAM-18 Na 1000  $\mu\text{M}$ ) y 6 estándares en el rango de 0,2  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ . El rango de concentración y el número de estándares empleado fue seleccionado con base en las concentraciones esperadas de los analitos en las muestras obtenidas de los ensayos de permeabilidad *in vitro*.

✓ Preparación de estándares de calibración

Se preparó una solución patrón de los analitos con concentración de 1000 µM, pesando 18,570 mg de ampicilina sódica, 13,368 mg de metoprolol tartrato y 19,900 mg de PAM-18 Na y llevando a volumen con agua tipo I en un matraz aforado de 50 ml. Partiendo de la solución anterior, se preparó una solución de 100 µM, tomando con micropipeta volumétrica 1 ml de solución 1000 µM y llevándola a volumen con agua tipo I en un matraz aforado de 10 ml.

Los volúmenes requeridos de solución 100 µM y de HBSS HEPES 25 mM para preparar los estándares de calibración se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Preparación de estándares de calibración.

Estándar	Concentración de ampicilina y metoprolol (µM)	Volumen de Solución 100 µM (µL)	Volumen de HBSS HEPES 25 mM (µL)	Volumen final (µL)
Blanco	---	---	1000	1000
1	0.2	2	998	1000
2	1	10	990	1000
3	5	50	950	1000
4	10	100	900	1000
5	30	300	700	1000
6	50	500	500	1000

Cada uno de los estándares se preparó siguiendo el mismo orden de adición. Primero, se adicionó el volumen de HBSS HEPES 25 mM y luego el volumen de solución 100 µM. Se homogenizaron con micropipeta volumétrica, se filtraron y finalmente se analizaron bajo las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 1.

Posteriormente, se relacionaron las áreas de los analitos versus las concentraciones y se realizó un análisis de regresión lineal empleando la herramienta estadística Minitab v. 16.1.0 para determinar la linealidad del método y la ecuación de la curva de calibración:  $y = mx + b$  donde  $y$  es el área,  $x$  la concentración y  $b$  el intercepto.

#### 6.2.4. Precisión y Exactitud

Se eligieron 3 concentraciones (baja, media y alta) en el rango de concentración de 0,2  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  y se prepararon 5 replicas por concentración. La concentración baja fue 0,5  $\mu\text{M}$ , la media 20  $\mu\text{M}$  y la alta 40  $\mu\text{M}$ .

La precisión y exactitud se midió durante 3 días consecutivos. Por cada día se prepararon y analizaron 15 muestras (5 replicas por concentración) junto con una curva de calibración con los dos analitos.

- ✓ Preparación de concentraciones 0,5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ .

Por cada día se preparó una solución patrón compuesta por ampicilina sódica, metoprolol tartrato y PAM-18 Na, a una concentración de 1000  $\mu\text{M}$  y, a partir de ésta se obtuvo una solución con concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

Los volúmenes requeridos de solución 100  $\mu\text{M}$  y de HBSS HEPES 25 mM para preparar las concentraciones 0,5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ , se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2. Preparación de muestras para la determinación de precisión y exactitud.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Volumen de Solución 100 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )	Volumen de HBSS HEPES 25 mM ( $\mu\text{L}$ )	Volumen final ( $\mu\text{L}$ )
0,5	5	995	1000
20	200	800	1000
40	400	600	1000

Como se describió en el parámetro de linealidad, las muestras se dispusieron en viales, se filtraron y analizaron bajo las condiciones descritas en la Tabla 1. Finalmente, mediante la herramienta estadística Minitab v.16.1.0 se determinó la precisión intra e inter día expresada como el coeficiente de variación calculado con la fórmula  $[\text{CV}\% = (\text{desviación estándar}/\text{valor promedio}) \times 100]$ , así como la exactitud del método expresada como el porcentaje del error relativo, determinado con la fórmula  $[(\text{Concentración promedio} - \text{concentración nominal})/\text{concentración nominal}] \times 100$ .

### **6.2.5. Estabilidad**

La estabilidad química de los analitos en la matriz se evaluó, al preparar por triplicado tres estándares de ampicilina sódica y metoprolol tartrato en concentraciones de 0.5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  bajo las condiciones específicas descritas a continuación:

#### **6.2.5.1. Estabilidad de congelamiento y descongelamiento**

Los estándares de ampicilina y metoprolol se sometieron a tres ciclos de 24 horas de congelamiento (-20 °C) y descongelamiento. Posteriormente, se analizaron y los resultados obtenidos se compararon con los datos de las muestras frescas.

#### **6.2.5.2. Estabilidad a corto plazo**

Los estándares de ampicilina y metoprolol se sometieron a descongelamiento a temperatura ambiente (25°C) y se analizaron después de transcurridas 4 y 8 horas.

#### **6.2.5.3. Estabilidad a largo plazo**

Las soluciones de ampicilina y metoprolol se almacenaron en el congelador (-20°C) durante 15 días. Los resultados obtenidos se compararon con los adquiridos a inicios del almacenamiento.

#### **6.2.5.4. Estabilidad post- preparativa**

Las soluciones de ampicilina y metoprolol en se mantuvieron en el automuestreador a temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas. Las muestras se analizaron al inicio y después de transcurridas 6,12 y 24 horas.

#### **6.2.5.5. Estabilidad de la solución stock**

La estabilidad de soluciones stock no se incluyo dentro de la validación, debido a dichas soluciones solo fueron preparadas en el momento de ser utilizadas. Lo anterior con el fin de obtener resultados fiables y no influenciados por fenómenos de degradación que pueden propiciarse al transcurrir el tiempo de almacenamiento de las mismas.

## MATRIZ DE MARCO LÓGICO

<b>Objetivo General:</b> Desarrollar y validar una metodología analítica para cuantificar la fracción de ampicilina permeada en células Caco- 2, con el fin de conocer el efecto de la matriz polimérica PAM- 18Na en el proceso de absorción intestinal.			
<b>Objetivo específico</b>	<b>Actividad</b>	<b>Indicador</b>	<b>Supuesto</b>
<b>Crear un método instrumental que permita la identificación y cuantificación de ampicilina en una matriz biológica proveniente de ensayos de permeabilidad in vitro, mediante la técnica UPLC-PDA.</b>	Revisión bibliográfica de las metodologías analíticas existentes para la determinación de ampicilina y metoprolol.	La metodología analítica se encuentra soportada bibliográficamente.	Se dispone de artículos científicos que provean la información necesaria para establecer las condiciones del análisis.
	Definir con criterio, las condiciones instrumentales más apropiadas para la determinación de los analitos.	La metodología propuesta es coherente con la naturaleza de los analitos y los requerimientos del ensayo.	Se posee conocimiento sobre los principios de cromatografía líquida.  Se cuenta con la asesoría docentes especialistas en cromatografía.
	Realizar inyecciones de ensayo con la metodología analítica seleccionada y hacer los ajustes pertinentes para lograr una adecuada separación de los analitos.	En los cromatogramas obtenidos, se observa una adecuada separación de los analitos.	-Se dispone de un estudiante capacitado en el manejo de UPLC.  -Se dispone de un equipo UPLC en perfectas condiciones, que permita la obtención de resultados totalmente fiables.
<b>Seguir los lineamientos establecidos por la FDA para la validación de</b>	Consultar las Guías Internacionales establecidas por la USP, FDA e ICH para la validación de	-Adaptación de las Guías Internacionales a las condiciones del ensayo.	-Se dispone de información suficiente para llevar a cabo la validación del método analítico de acuerdo a

<b>métodos bioanalíticos.</b>	métodos analíticos.	-Establecimiento de un cronograma de validación.	normativas internacionales.  -El estudiante está en capacidad de interpretar la información de las Guías y de cumplir los requerimientos que éstas exigen.  -El estudiante presente destreza en la preparación rápida y simultánea de muestras.
	Evaluar cada uno de los parámetros de validación: selectividad, precisión y exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y estabilidad.	Se cumple diariamente con las actividades del cronograma de validación.	Se cuenta con una amplia disponibilidad del equipo UPLC, durante el tiempo que tome la validación.
	Procesar los datos obtenidos de la validación mediante el Software Empower 3.	Se creó un método de procesamiento que permite la identificación de los analitos e integración de sus áreas.	El estudiante posee al menos, conocimiento básico acerca de la creación de métodos de procesamiento y reporte de resultados.
	Emplear el paquete Minitab v.16.1., para realizar el tratamiento estadístico de los datos de la validación.	Los resultados obtenidos para cada parámetro de validación, se encuentran dentro de los rangos permitidos por las Guías Internacionales	-Se dispone de la licencia del paquete estadístico Minitab V.16.1 y de otras herramientas de apoyo como Statgraphics y Microsoft Office Excel.

		(FDA, USP).	<p>-El estudiante tiene conocimientos en temas como regresión lineal, análisis de varianza, etc.; maneja el paquete Minitab v.16.1 y sabe interpretar sus resultados.</p> <p>-Se dispone de profesores asesores en el área estadística.</p>
<p><b>Aplicar la metodología analítica validada, al análisis de una serie de muestras obtenidas en ensayos de permeabilidad in vitro con células Caco-2.</b></p>	<p>Planificar como se haría el análisis de las muestras (número máximo de muestras por día, orden de inyección, etc.).</p>	<p>El orden establecido para el análisis de las muestras facilitó la gestión rápida de las mismas.</p>	<p>Disponibilidad completa del UPLC, debido al tiempo que demanda el análisis de este gran número de muestras (en total, 288).</p>
	<p>Descongelar, filtrar y analizar las muestras con el método analítico validado, para posteriormente cuantificar la cantidad presente de los analitos en las muestras.</p>	<p>Fue posible identificar y cuantificar los analitos en todas las muestras analizadas.</p>	<p>Durante cada corrido o análisis de las muestras, se realizó una curva de calibración que permitiera la posterior cuantificación de los analitos.</p>

## **7. IMPACTO AMBIENTAL DEL PROYECTO**

Dado que en el presente proyecto se desarrolló y validó un método analítico empleando la técnica UPLC, se requirió el uso continuo de solventes orgánicos como acetonitrilo, metanol y de buffers como el fosfato de sodio monobásico; que claramente al ser desechados sin prevención, podrían presentar un impacto negativo sobre el ambiente.

Sin embargo, debido a que la técnica UPLC maneja un sistema de alta presión y partículas de fase estacionaria de pequeño tamaño, etc., los volúmenes de solvente empleados y por tanto los residuos generados se reducen significativamente en comparación con otras técnicas analíticas (Armenta, 2008).

Adicionalmente, cabe recalcar que la Universidad Icesi ha diseñado un plan para el manejo de residuos provenientes de los laboratorios de docencia e investigación, con el fin de brindarles una adecuada disposición final y mitigar los efectos perjudiciales que puedan generarse por la naturaleza de los mismos.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Desarrollo del método analítico

Una vez definido el equipo con el que se desarrollaría el método analítico, el siguiente paso fue determinar el tipo de columna y posteriormente el tipo de detector.

Se empleó una columna de fase reversa ACQUITY UPLC CSH funcionalizada con C18 (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm) porque este tipo de columnas son de primera elección para la separación de muestras tanto neutras como iónicas, pero además porque al poseer material de relleno híbrido (tetraetoxisiloxano y etil-bis-trietoxisiloxano) cuentan con gran estabilidad cuando se emplean a valores de pH altos y bajos; alta resistencia mecánica cuando se trabaja a presiones altas, que son características del UPLC.

Después de seleccionar la columna, se creó un método instrumental de elución por gradiente, en el que se empleó como fase móvil agua acidulada (con ácido fórmico 0.1%) y acetonitrilo, flujo de 0,5 ml/min, temperatura de columna de 24,5°C y de muestra 15°C, rango de detección de 210-220nm y tiempo de corrido de 8 minutos.

Tabla 3. Gradiente de elución de método analítico No. 1.

<b>Tiempo</b>	<b>Agua acidulada (%)</b>	<b>Acetonitrilo (%)</b>
Inicial	95	5
2	75	25
3	50	50
4	25	75
5	5	95
6	50	50
8	95	5

Se seleccionó esta fase móvil porque en cromatografía de fase reversa generalmente se emplea una mezcla de agua y un solvente orgánico como acetonitrilo, metanol, isopropanol, etc., siendo el acetonitrilo el más usado por poseer características como miscibilidad en agua, poca viscosidad, fácil disponibilidad y costo moderado.

La longitud de onda de detección se seleccionó según lo reportado en la bibliografía, según la cual ampicilina absorbe en el rango de 210 nm – 220 nm (Mizuma, 2005) (Saitoh, 2002) (Ortíz, 2002) (Escudero, 2002) y metoprolol en el rango de 220- 225 (Garg, 2008).

Dado que el equipo UPLC posee dos tipos de detectores, el PDA (photodiode - array detector) y el ELSD (Evaporative Light-Scattering Detector), se analizaron una serie de estándares de 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm y 100 ppm, usando ambos detectores, con el fin de definir cuál usar. El PDA es un detector de absorbancia UV-Vis de longitud de onda variable, en el que la radiación emitida por una lámpara de deuterio pasa a través de una celda de flujo en dirección a una rejilla holográfica, donde la luz se dispersa y dirige a una serie de diodos que permiten medir simultáneamente en todo el rango de longitudes de onda seleccionado. Por su parte, el ELSD es un detector universal, en el cual el efluente de la columna se nebuliza en una corriente de nitrógeno y se evapora en un tubo de deriva climatizado, dejando las partículas no volátiles suspendidas en el gas portador, de modo que la luz dispersada por las partículas es detectada por un fotodetector montado en un ángulo fijo del rayo incidente.

A continuación se muestran algunos cromatogramas obtenidos utilizando ambos tipos de detectores:

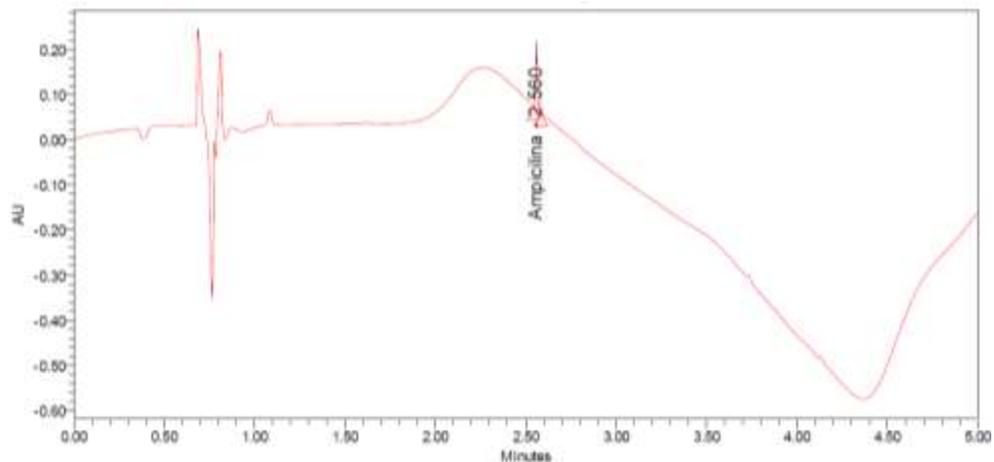


Gráfico 1. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica 10 ppm-  
Detección PDA.

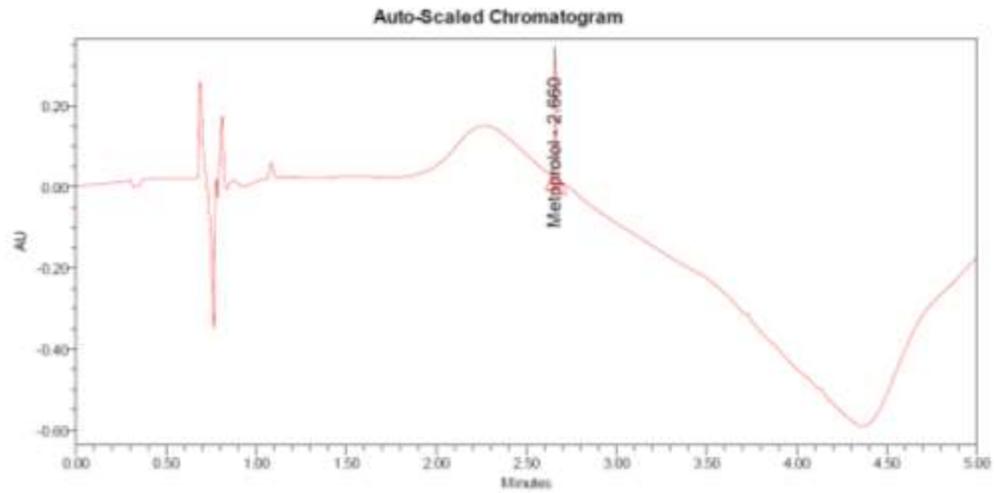


Gráfico 2. Cromatograma obtenido para estándar de metoprolol 10 ppm-  
Detección PDA.

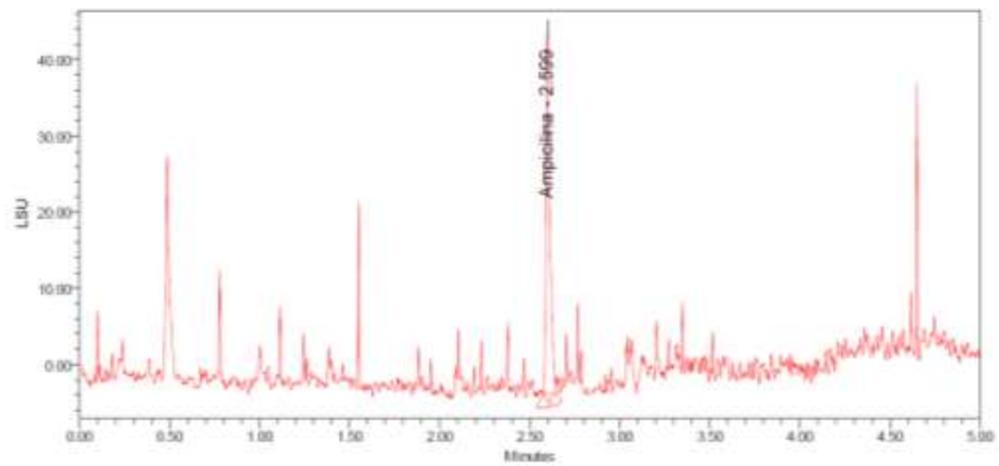


Gráfico 3. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica 10 ppm-  
Detección ELSD.

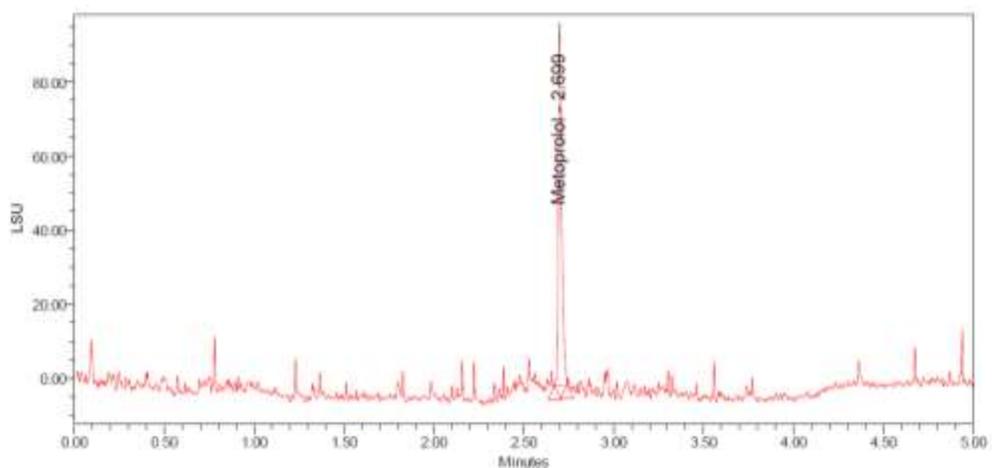


Gráfico 4. Cromatograma obtenido para estándar de metoprolol 10 ppm-  
Detección ELSD.

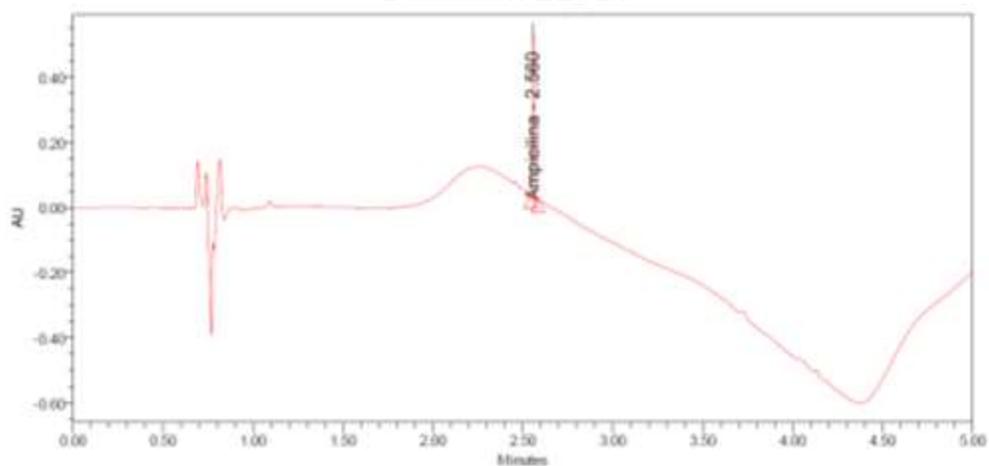


Gráfico 5. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica 50 ppm-  
Detección PDA.

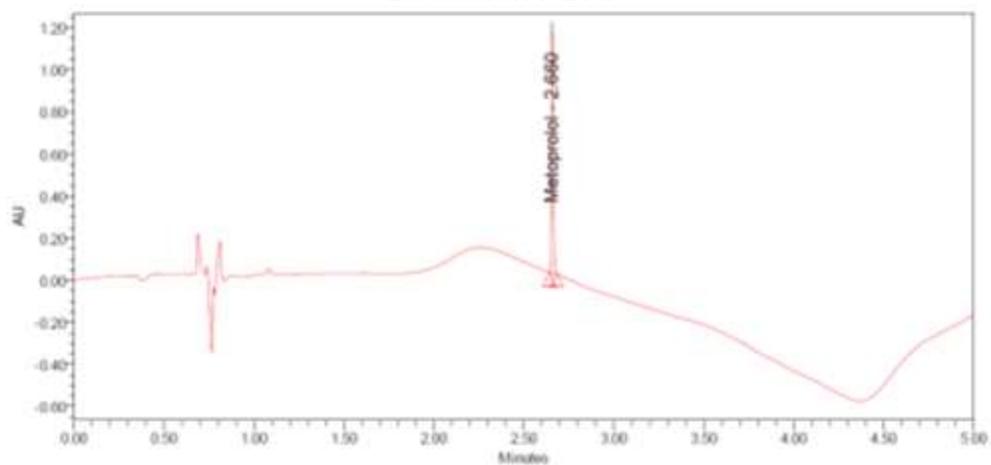


Gráfico 6. Cromatograma obtenido para estándar de metoprolol 50 ppm-  
Detección PDA.

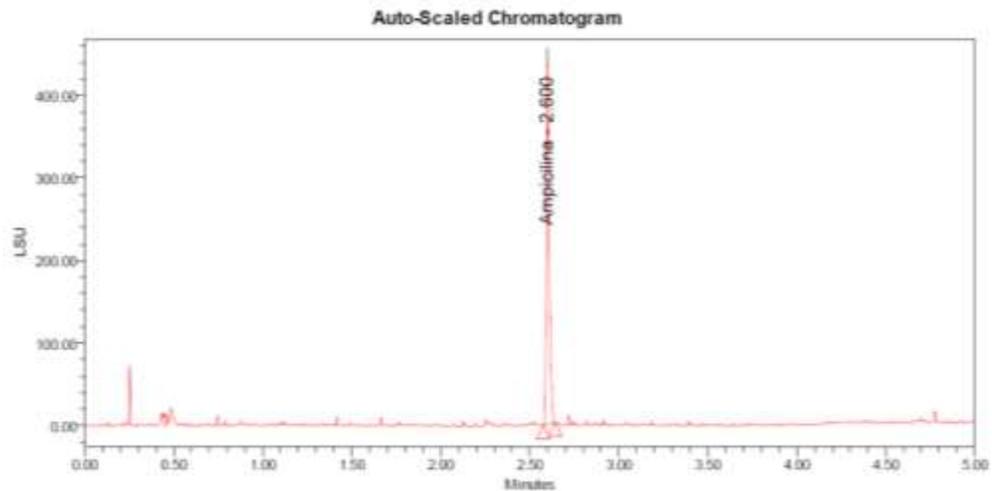


Gráfico 7. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica 50 ppm-  
Detección ELSD.

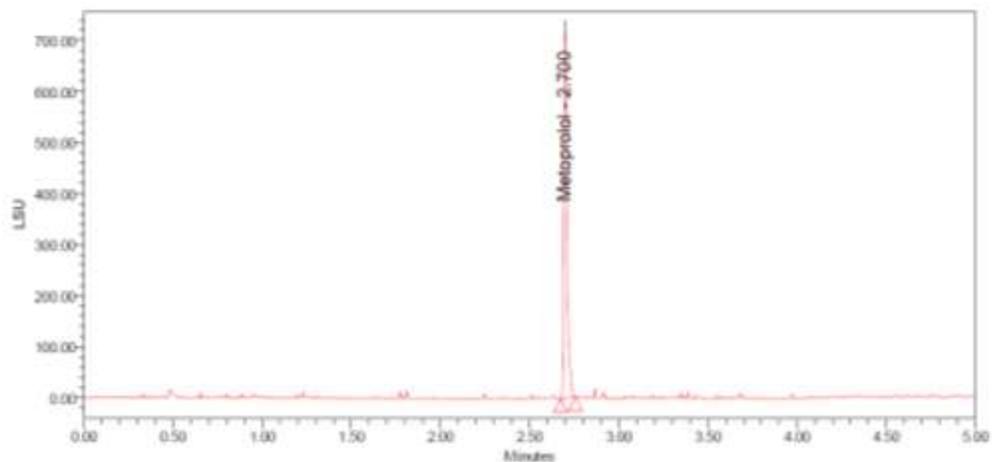


Gráfico 8. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica 50 ppm-  
Detección ELSD.

Al revisar los cromatogramas, se observa que con ambos detectores pueden obtenerse picos bien definidos para los analitos, sin embargo, cuando la concentración de ampicilina y metoprolol es baja, la detección ELSD no es una alternativa, pues el ruido que se registra en los cromatogramas es significativo y resulta difícil diferenciar el pico de interés del ruido de fondo, lo que es de esperarse porque el ELSD es un detector de baja sensibilidad. Por lo anterior, en la mayoría de métodos desarrollados por HPLC se emplean detectores como el PDA; solamente se elige otro detector cuando el analito presenta poca o ninguna absorción en el UV o visible, cuando existen interferentes en la muestra o cuando solo se requiere información estructural cualitativa.

De esta forma, se seleccionó el PDA porque las cantidades a analizar de los analitos son muy bajas (0,2- 50 $\mu$ M) y se requiere que sean cuantificados con exactitud debido a la aplicabilidad de los resultados en los estudios de biodisponibilidad. Además, cabe mencionar que el hecho de emplear ELSD demanda un costo adicional por el consumo de nitrógeno y por tanto su uso debe ser justificado y conservado solo cuando el PDA no se ajusta a los requerimientos del estudio.

En éstos primeros ensayos, se observó que ampicilina y metoprolol presentaban un tiempo de retención muy similar, el primero a 2.6 min y el segundo a 2.7min, por lo que se planteó realizar modificaciones en el método con el fin de lograr una mayor separación de los picos. Así, se consideró sustituir el componente acuoso de la fase móvil por un buffer de fosfato de sodio monobásico que permitiera mantener un pH constante durante la separación, lo cual es esencial en muestras que contienen ácidos o bases cuyo grado de ionización depende del pH en el que se encuentren, como es el caso de la ampicilina (compuesto anfótero) y el metoprolol (compuesto básico).

Posteriormente, se probaron algunos métodos isocráticos con el fin de observar diferencias en cuanto a tiempos de retención, resolución, etc., cuando se emplean distintos modos de elución. En éste método se redujo el tiempo de corrido a 4 min porque el primer ensayo mostró que los analitos eluyen rápidamente y porque además el objetivo era ajustar las condiciones instrumentales para que se obtuviera un método rápido que permitiera la determinación simultánea de los dos activos. Los cromatogramas obtenidos se muestran:

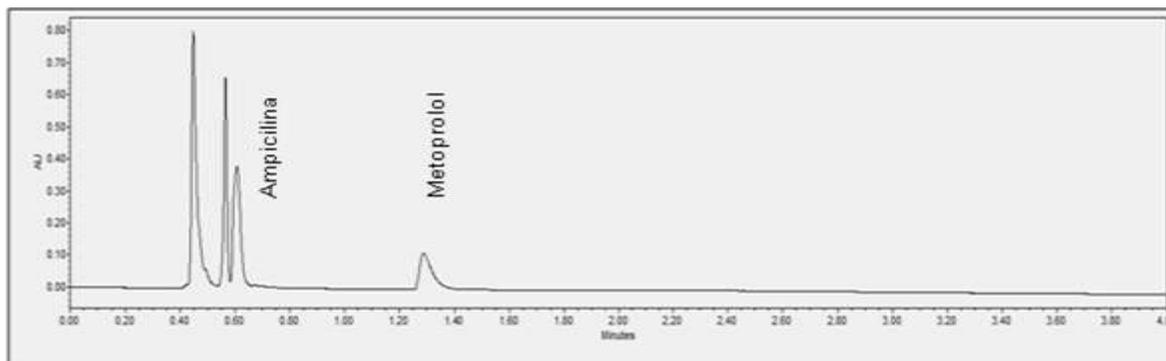


Gráfico 9. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica y metoprolol tartrato 50 ppm (Buffer 65%-ACN 35 %).

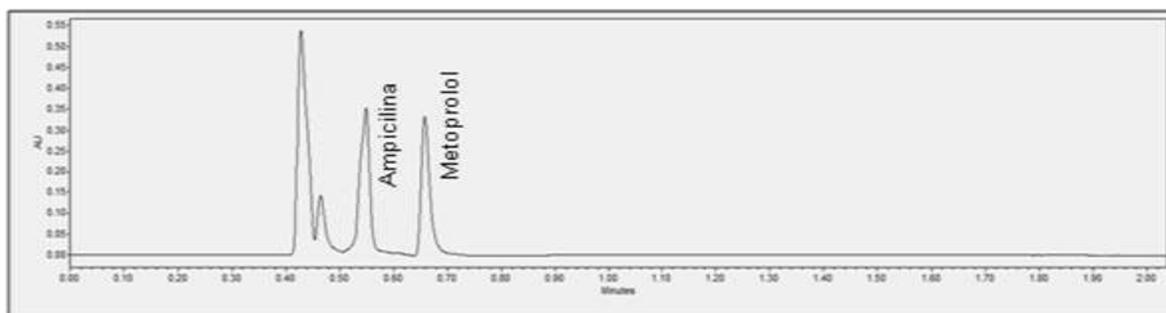


Gráfico 10. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica y metoprolol tartrato 50 ppm (Buffer 75%-ACN 25 %).

Como se observa en los cromatogramas, es posible modificar los tiempos de retención si se modifica la composición de la fase móvil, siendo claro que el primer activo en eluir es la ampicilina porque posee un carácter más hidrofílico que el metoprolol, lo cual puede notarse si se comparan sus coeficientes de partición n-octanol/agua, que son de 1.0 para la ampicilina y de 1.9 para metoprolol. Por lo anterior, cuando se incrementa el contenido del solvente orgánico es posible retener por un mayor tiempo el metoprolol y así lograr separarlo del pico de ampicilina, que era un inconveniente presente con el método antes descrito, no obstante se evidencia que con éste método aparece un nuevo pico cercano al de ampicilina que podría llegar a solaparse con éste (Gráfico 9), comprometiéndose así la selectividad del método.

Consecuente a ello, se decide ensayar un nuevo método instrumental de elución por gradiente pero ésta vez usando buffer de fosfato de sodio monobásico a pH 4.5. Debe mencionarse que este valor de pH se eligió no solo porque aparece reportado en la bibliografía, sino porque se realizaron pruebas empleando buffers con pH 7 y 4.5 y fue con éste último que se evidenció una mayor separación de los analitos.

Así, primero se planteó un gradiente de elución con duración de 2 min, con el fin de revisar como se modificaban los tiempos de retención y conocer si existía la necesidad de realizar ajustes adicionales.

Tabla 4. Gradiente de elución de método analítico No.2.

Tiempo	Buffer pH 4.5	Acetonitrilo (%)
Inicial	70	30
0,5	55	45
1,5	70	30
2	70	30

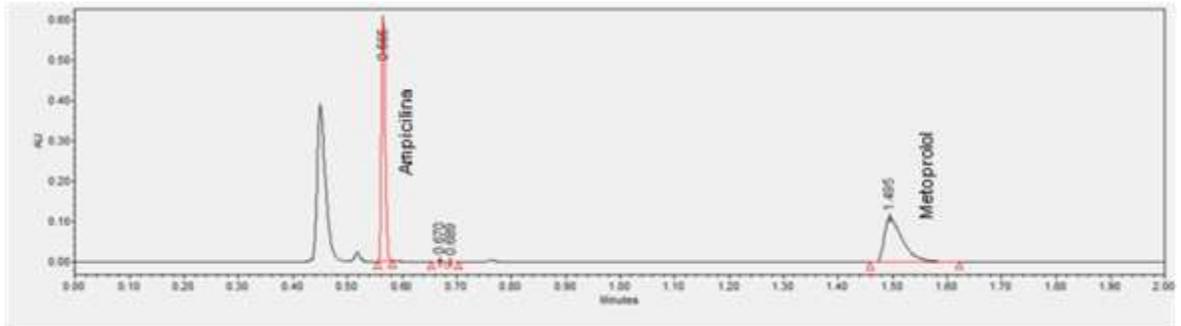


Gráfico 11. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica y metoprolol tartrato 50 ppm.

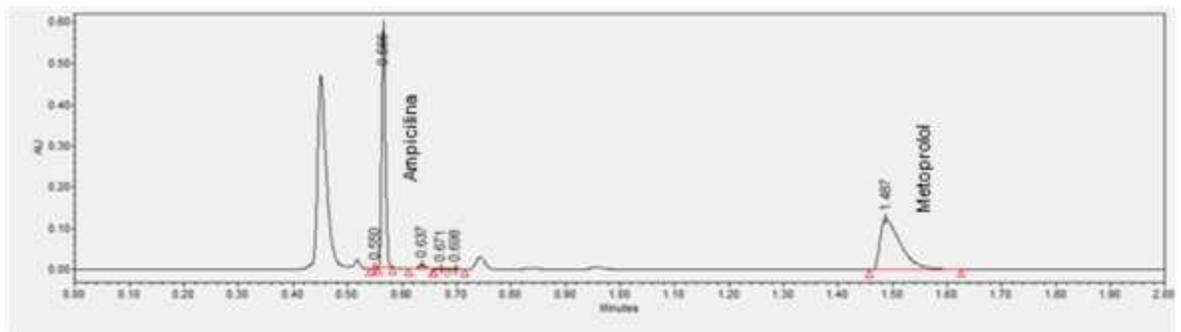


Gráfico 12. Cromatograma obtenido para solución de ampicilina sódica , metoprolol tartrato y PAM 18-NA 50 ppm.

Con éste método se logró que los picos de los analitos se separaran lo suficiente y además se obtuvieron picos simétricos, aunque en el caso del metoprolol se presenta asimetría posterior o coleo, que es una forma que adquiere el pico cuando existe una interacción fuerte entre las moléculas del analito con la fase estacionaria, no obstante revisando otros trabajos publicados, se encontró que el metoprolol presenta tendencia hacia esa forma de pico (Garg, 2008).

En cuanto al gradiente de elución propuesto, puede notarse que se inicia con un 70% de buffer y un 30% de ACN y después del minuto 0.6 se disminuye la proporción a 55% y 45 % respectivamente. La razón de lo anterior, es porque la ampicilina es un compuesto anfotérico que por poseer grupos ácidos- COOH y grupos básicos -NH<sub>2</sub>, se ioniza a valores de pH por encima de 4 pero por debajo de 8, donde tanto los grupos carboxilo como amina son ionizados, al estar ionizados poseen afinidad por la fase más polar y por tanto la elución se hace más rápida; sin embargo al minuto 0.6 se incrementa el contenido de acetonitrilo con el fin de que el metoprolol se retenga por un mayor tiempo, gracias a la afinidad de éste con los solventes menos polares.

Otro aspecto a considerar, es que se realizó un cambio en la temperatura de la columna de 25.4°C a 40°C, debido a que esta acción es una opción para mejorar la selectividad. Finalmente, se recibió asesoría por parte de un docente quien sugirió que aunque los analitos eluían antes de los dos minutos, siempre es adecuado ampliar un poco el tiempo de corrido con el fin de lograr una estabilización de la columna y prepararla para una próxima inyección, por lo que el tiempo de corrido paso de 2 a 4 minutos. A continuación se muestra una tabla resumen con las condiciones del método final, así como algunos cromatogramas obtenidos con el mismo, logrando identificar y cuantificar cantidades en el orden de  $\mu\text{M}$ .

Tabla 5. Condiciones instrumentales del método analítico final.

<b>Parámetros instrumentales</b>	<b>Condiciones</b>
Fase móvil	Buffer fosfato de sodio (5mM) pH 4.5 Acetonitrilo
Elución	Gradiente
Flujo	0,5 ml/min
Columna	CSH 2,1 mm X 100 mm-1,7 $\mu\text{m}$
Volumen de inyección	2 $\mu\text{l}$
Longitud de onda	215 nm
Temperatura de columna	30°C
Temperatura de automuestreador	15°C
Presión del sistema	10.000 psi
Tiempos de retención	Ampicilina: 0,565 Metoprolol: 1,520
Tiempo de corrido	4 minutos

Tabla 6. Gradiente de elución del método analítico final.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% Buffer fosfato pH 4.5</b>	<b>% Acetonitrilo</b>
Inicial	80	20
0,5	70	30
1,0	30	70
1,5	30	70
1,6	80	20
4,0	80	20

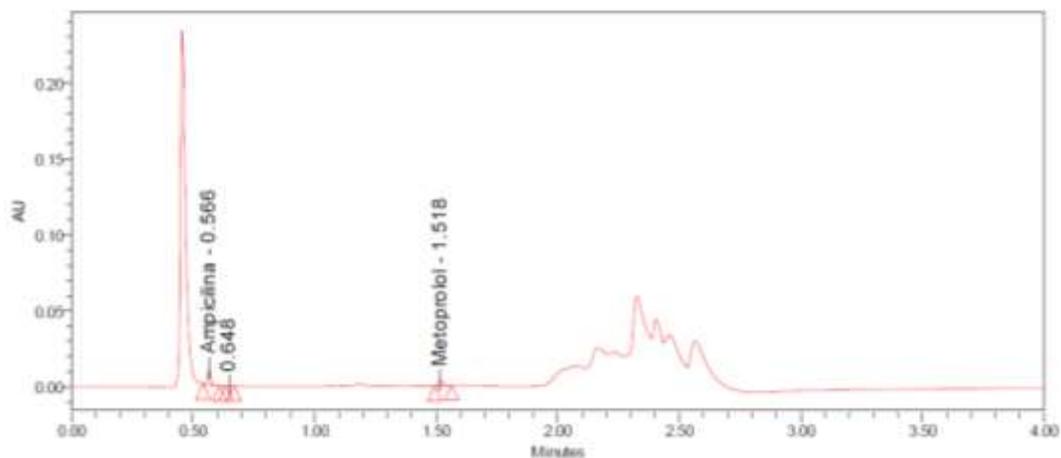


Gráfico 13. Cromatograma obtenido para solución de ampicilina sódica, metoprolol tartrato y PAM 18-Na 5  $\mu$ M.

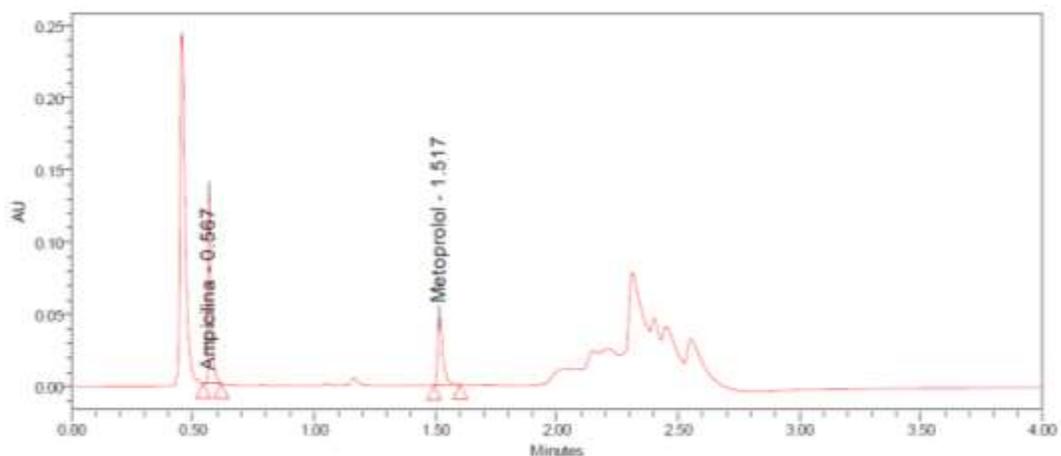


Gráfico 14. Cromatograma obtenido para solución de ampicilina sódica, metoprolol tartrato PAM 18-Na 50  $\mu$ M.

## 8.2. Validación del método analítico

Para analizar los resultados, se utilizó el programa estadístico Minitab® versión 16.1.0, Minitab Inc., 2010 y como programa de apoyo, el Statgraphics® versión 15.2.06, StatPoint Inc., 1982-2007.

### 8.2.1. Especificidad

Al analizar seis muestras blanco compuestas por el medio HBSS HEPES y PAM-18 Na 1000 $\mu$ M, no se encontraron durante el tiempo de análisis, picos que interfirieran con la respuesta de ampicilina y metoprolol, cuyos tiempos de

retención son 0,565 min y 1,520 min, respectivamente. Así, el método está en capacidad de diferenciar los analitos de interés en presencia de los demás componentes de la muestra y asegurar que su respuesta no está influenciada por los mismos. Abajo se muestran los cromatogramas obtenidos para dos de las réplicas de muestra blanco.

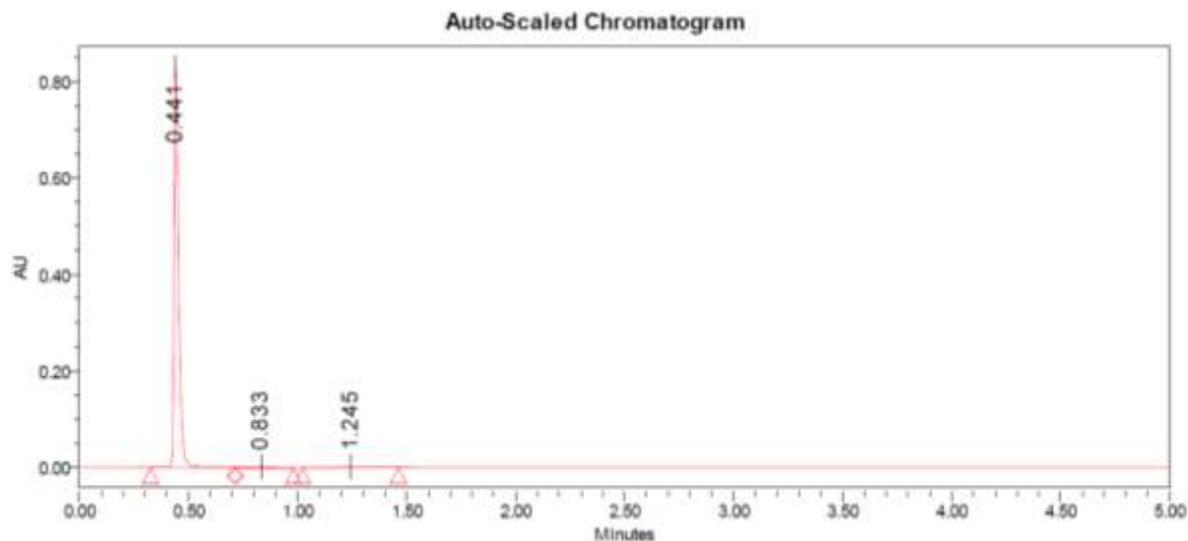


Gráfico 15a. Cromatograma obtenido para muestra blanco (réplica 2).

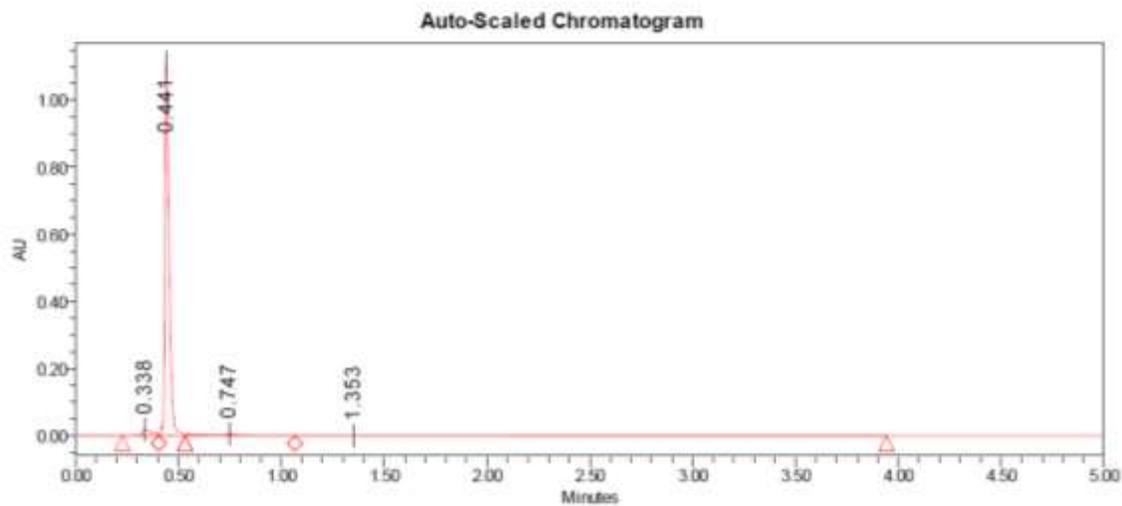


Gráfico 15b. Cromatograma obtenido para muestra blanco (réplica 3).

### 8.2.2. Límite de Detección y Cuantificación

Para calcular el límite de detección y cuantificación del método se emplearon dos fórmulas reportadas en la literatura:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{m * 3^{1/2}}$$

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{m * 3^{1/2}}$$

Siendo:

$Y_{bl}$ , el intercepto obtenido al graficar la concentración de estándares de 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  versus el área de los mismos.

$S_{bl}$ , el intercepto obtenido a graficar la desviación estándar de las 3 replicas de cada estándar de 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$  versus la concentración de los mismos.

$m$ , la pendiente obtenida al graficar las concentraciones de los estándares versus las concentraciones.

Al realizar los cálculos, se obtiene que la cantidad más pequeña que el equipo es capaz de cuantificar es de 0,2  $\mu\text{M}$ , mientras que puede detectar concentraciones de hasta 0,1  $\mu\text{M}$  respectivamente.

### 8.2.3. Linealidad

Los resultados obtenidos para los analitos ampicilina y metoprolol se muestran a continuación:

Tabla 7. Resultados Linealidad

Concentración ampicilina ( $\mu\text{M}$ )	Área ampicilina	Concentración metoprolol ( $\mu\text{M}$ )	Área metoprolol
0,2	3780	0,2	920
0,2	432	0,2	334
0,2	1108	0,2	368

1	8646	1	2202
1	8974	1	2246
1	8294	1	1740
5	16598	5	11064
5	19240	5	10966
5	17174	5	9992
10	35218	10	25016
10	32748	10	18500
10	35180	10	23240
30	104940	30	69700
30	94632	30	54016
30	105366	30	71400
50	180272	50	120456
50	193938	50	118432
50	194720	50	135690

Antes de ajustar los resultados a un modelo lineal, se realizó un gráfico de dispersión con el fin de visualizar si éstos presentaban un comportamiento lineal.

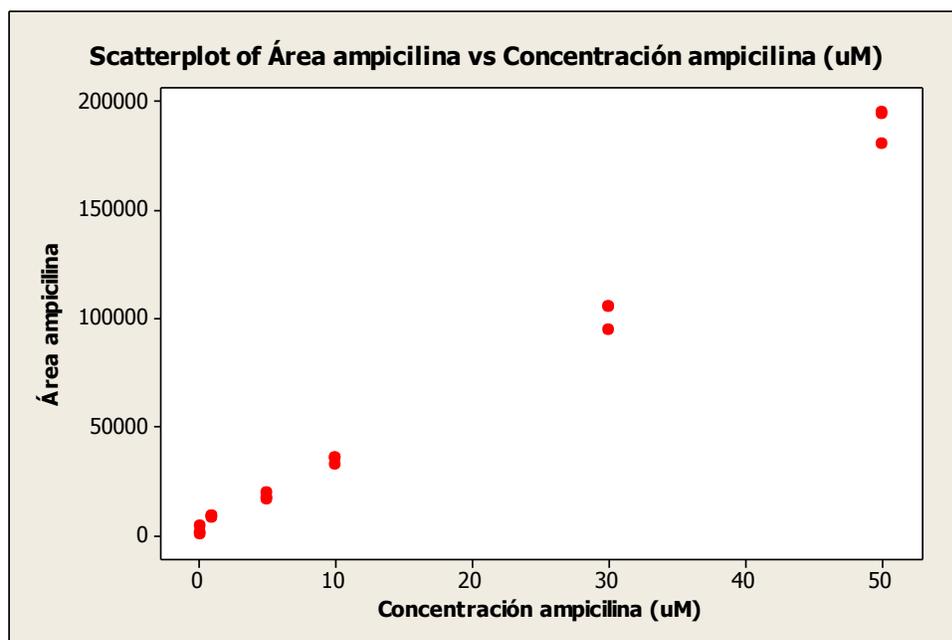


Gráfico 16. Gráfico de dispersión para ampilina sódica.

Se observa que los resultados muestran un comportamiento lineal, no obstante, se realizó una comparación de modelos alternos (Tabla 8) en la que se ajustaron

varios modelos curvilíneos a los resultados, encontrándose que el modelo lineal es el que arroja el valor de R cuadrado más alto y por tanto fue el seleccionado.

Tabla 8. Comparación de modelos alternos para ampicilina sódica.

Modelo	Correlación	R-Cuadrada
Lineal	0,9960	<b>99,21%</b>
Cuadrado Doble	0,9939	98,78%
Raíz Cuadrada Doble	0,9936	98,73%
Cuadrado de X	0,9827	96,57%
Raíz Cuadrada de Y	0,9819	96,42%
Multiplicativa	0,9672	93,54%
Raíz Cuadrada de X	0,9572	91,62%
Cuadrado de Y	0,9489	90,03%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0,9211	84,85%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0,9160	83,90%
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0,9156	83,84%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0,8663	75,04%
Curva S	-0,8426	70,99%
Exponencial	0,8328	69,35%
Logaritmo de X	0,8112	65,81%
Doble Inverso	0,7625	58,14%
Log-Y Cuadrado-X	0,7267	52,82%
Cuadrado-Y Log-X	0,6818	46,49%
Inversa de X	-0,4740	22,47%
Cuadrado-Y Inversa de X	-0,3504	12,28%
Inversa-Y Cuadrado-X	-0,2623	6,88%

Al realizar un análisis de regresión lineal simple, se obtiene la ecuación del modelo ajustado:  $y = mx + b$ , donde  $y$  es el área,  $x$  la concentración y  $b$  el intercepto.

Para Ampicilina:

$$\text{Área ampicilina} = -52,6437 + 3680,55 \times \text{Concentración ampicilina}$$

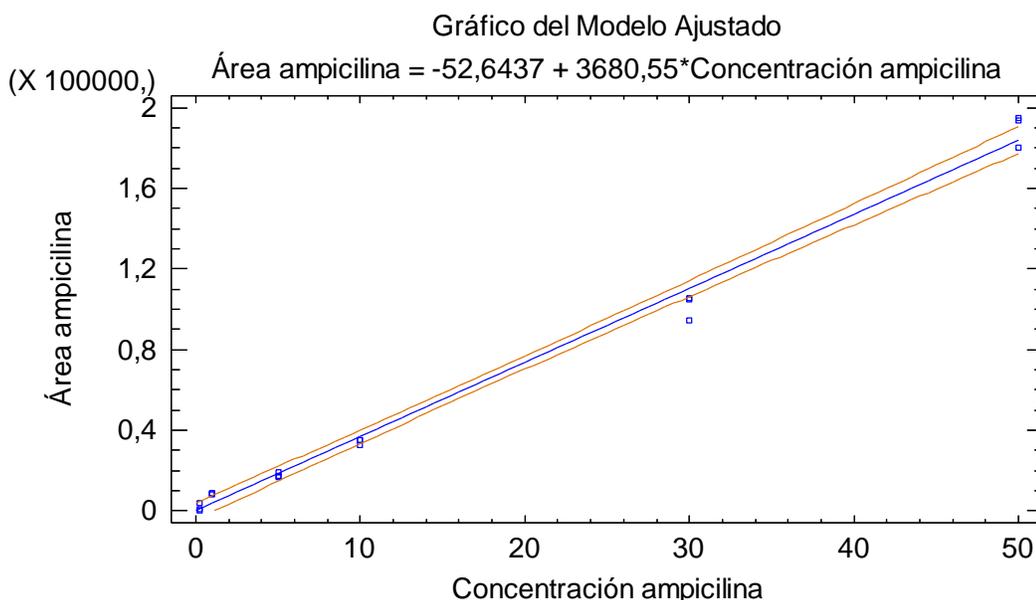


Gráfico 17. Gráfico del modelo ajustado para ampililina sódica. Nota: Las líneas coloreadas de rojo describen los límites de confianza para el modelo.

Dado que el valor P (0,0000) en la tabla ANOVA es menor que el nivel de significancia seleccionado (0,05), se evidencia que existe una relación estadísticamente significativa entre el área de ampililina y la concentración de ampililina con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R- cuadrado indica que el modelo ajustado explica el 99,2101% de la variabilidad en el área de ampililina y el coeficiente de correlación de 0,996043 indica una relación relativamente fuerte entre las variables.

Posteriormente, al evaluar la presencia de residuos atípicos, es decir, aquellas observaciones con residuos estudentizados mayores a 2 (en valor absoluto), se encontró que la réplica 2 de la concentración 30 μM presenta un residuo estudentizado incluso mayor a 3, lo que lleva a que se trate como valor aberrante y sea eliminado del modelo. Además, la réplica 3 de la concentración 50μM presentó un residuo estudentizado un poco mayor a 2, que aunque es atípico no requiere ser eliminado (Tabla 9).

Debe dejarse explícito que los residuos estudentizados son aquellos que miden el número de desviaciones estándar que se desvía cada valor observado del área de ampililina del modelo ajustado.

Tabla 9. Residuos atípicos obtenidos en la curva de calibración de ampicilina sódica.

			Predicciones		Residuos
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados
14	30,0	47316,0	55182,0	-7865,97	<b>-3,32</b>
18	50,0	97360,0	91987,5	5372,5	2,17

Al eliminar el dato aberrante del modelo, se obtiene una nueva ecuación para el mismo:

$$\text{Área ampicilina} = 256,685 + 3721,05 \times \text{Concentración ampicilina}$$

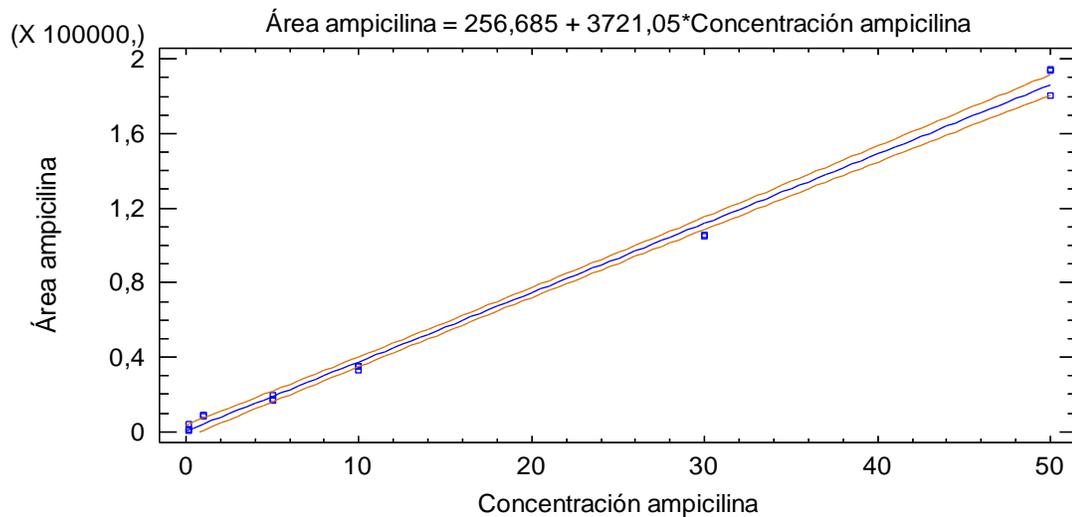


Gráfico 18. Gráfico del modelo ajustado después de eliminar dato aberrante.

Así, se obtuvo un nuevo y mayor valor del estadístico R- cuadrado que fue de 99,5356 y un coeficiente de correlación de 0,99768, lo que refleja una relación mucho más fuerte entre las variables área y concentración.

Una vez se ha propuesto un modelo para el ajuste de los datos se establece que los residuales deben cumplir los siguientes supuestos:

1. Los errores se distribuyen normalmente
2. Los errores poseen varianza constante

Para verificar el cumplimiento del primer supuesto, se realiza una prueba de normalidad, donde se hace necesario el planteamiento de dos hipótesis:

**Hipótesis nula (Ho):** Los residuos se distribuyen normalmente.

**Hipótesis alternativa (Hi):** Los residuos no se distribuyen normalmente.

**Regla de decisión:** Se rechaza la hipótesis nula, si el valor P es menor que el nivel de significancia de 0,05.

El resultado arrojado para esta prueba, se resume en el gráfico 19.

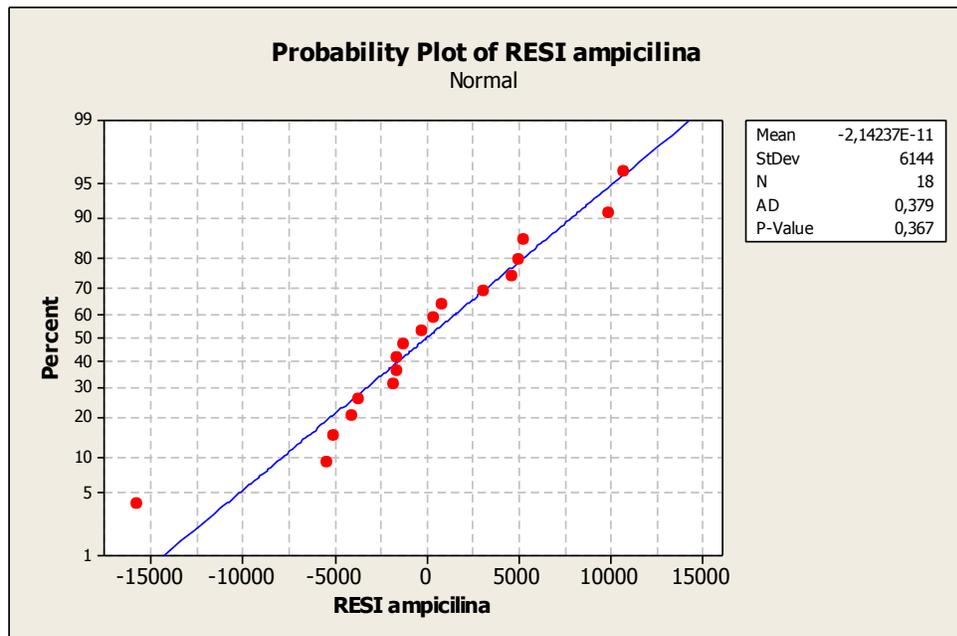


Gráfico 19. Gráfico de Normalidad para ampilina sódica.

Como se observa, el valor P (0,367) es mayor que el nivel de significancia de 0,05, por tanto no se existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula y se dice que los residuos se distribuyen normalmente. Es importante realizar la prueba de normalidad porque en algunos casos, aunque los datos se ajusten a una línea recta puede ser que no provengan de una distribución normal (Ramírez, G. 2013)

Finalmente, para verificar el cumplimiento del segundo supuesto, se realizó la prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett, cuyo resultado se resume en el gráfico 20.

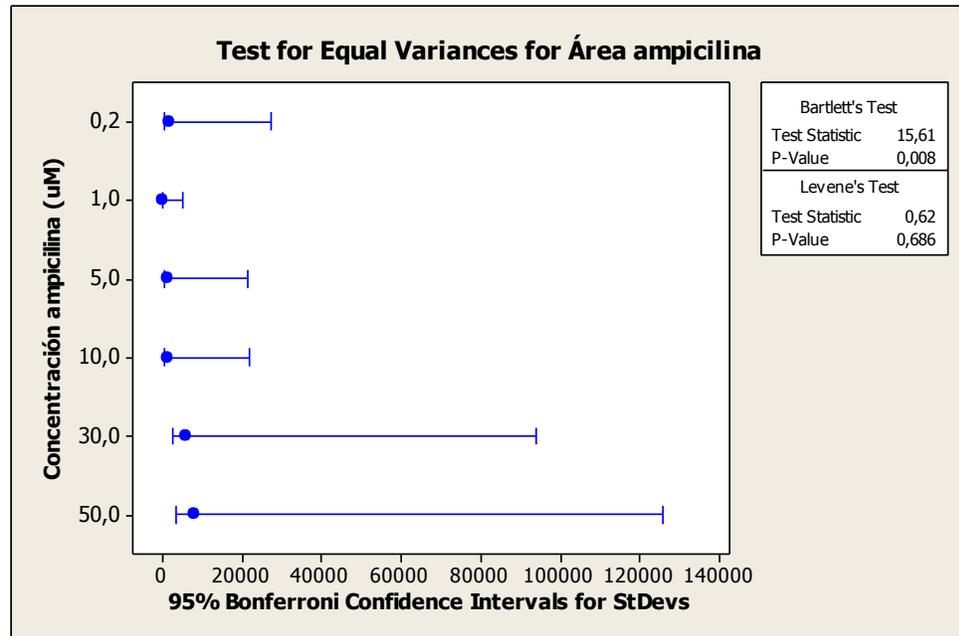


Gráfico 20. Gráfico de Homogeneidad de Varianzas de ampilicina sódica.

Para realizar esta prueba se deben plantear las siguientes hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** Los residuales poseen varianza constante

**H<sub>1</sub>:** Los residuales no poseen varianza constante

**Regla de decisión:** Se rechaza la hipótesis nula, si el valor P es menor que el nivel de significancia de 0,05.

El programa Minitab® v.16.1.0 emplea dos tipos de prueba para calcular el valor P, sin embargo, se empleará la Prueba de Levene, debido a que se ha reportado que es una prueba más robusta que la de Bartlett (Correa, C. et al., 2006). Así, como el valor P (0,686) es mayor que el nivel de significancia de 0,05, los residuales poseen una varianza constante.

El procedimiento estadístico realizado para ampilicina sódica, se aplicó igualmente al activo metoprolol tartrato, encontrándose que:

Existen tres residuos estudentizados con un valor mayor a 3, considerados como datos aberrantes y excluidos del modelo.

Tabla 10. Residuos atípicos obtenidos en la curva de calibración de metoprolol.

			Predicciones		Residuos
Fila	X	Y	Y	Residuos	Studentizados
11	10,0	9250,0	11571,6	-2321,59	<b>-5,16</b>
14	30,0	27008,0	35887,5	-8879,51	<b>-4,64</b>
18	50,0	67845,0	60377,1	7467,91	<b>3,92</b>

Después de eliminar los datos aberrantes se realizó un gráfico de dispersión. Los resultados exhibieron igualmente un comportamiento lineal (Gráfico 19), que se corroboró con la comparación de modelos alternos.

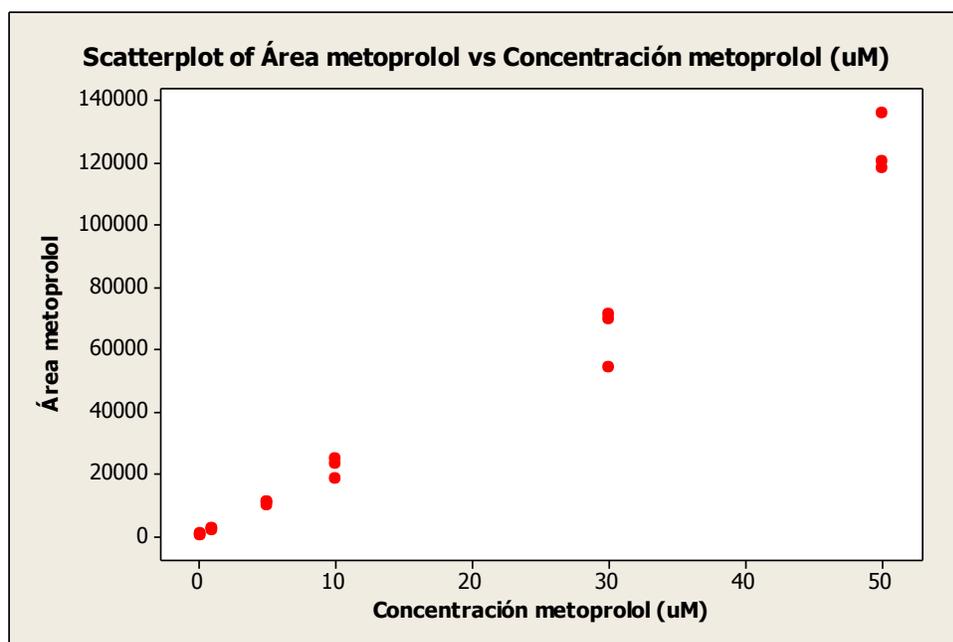


Gráfico 21. Gráfico de Dispersión para metoprolol.

Tabla 11. Comparación de modelos alternos para metoprolol.

<b>Modelo</b>	<b>Correlación</b>	<b>R-Cuadrada</b>
Lineal	0,9998	<b>99,96%</b>
Cuadrado Doble	0,9997	99,95%
Raíz Cuadrada Doble	0,9993	99,87%
Multiplicativa	0,9934	98,69%
Raíz Cuadrada de Y	0,9731	94,70%
Cuadrado de X	0,9715	94,39%
Raíz Cuadrada de X	0,9695	93,99%
Cuadrado de Y	0,9678	93,66%
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0,9340	87,23%
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0,9264	85,81%
Doble Inverso	0,9159	83,89%
Raíz Cuadrada-X Cuadrado-X	0,8958	80,24%
Cuadrado-Y Raíz Cuadrada-X	0,8895	79,13%
Exponencial	0,8313	69,11%
Curva S	-0,8283	68,62%
Logaritmo de X	0,8225	67,65%
Log-Y Cuadrado-X	0,7084	50,18%
Cuadrado-Y Log-X	0,6999	48,98%
Inversa de X	-0,4724	22,32%
Cuadrado-Y Inversa de X	-0,3574	12,77%
Inversa-Y Cuadrado-X	-0,3351	11,23%

La ecuación del modelo lineal ajustado fue:

$$\text{Área metoprolol} = -429,511 + 2389,32 \times \text{Concentración metoprolol}$$

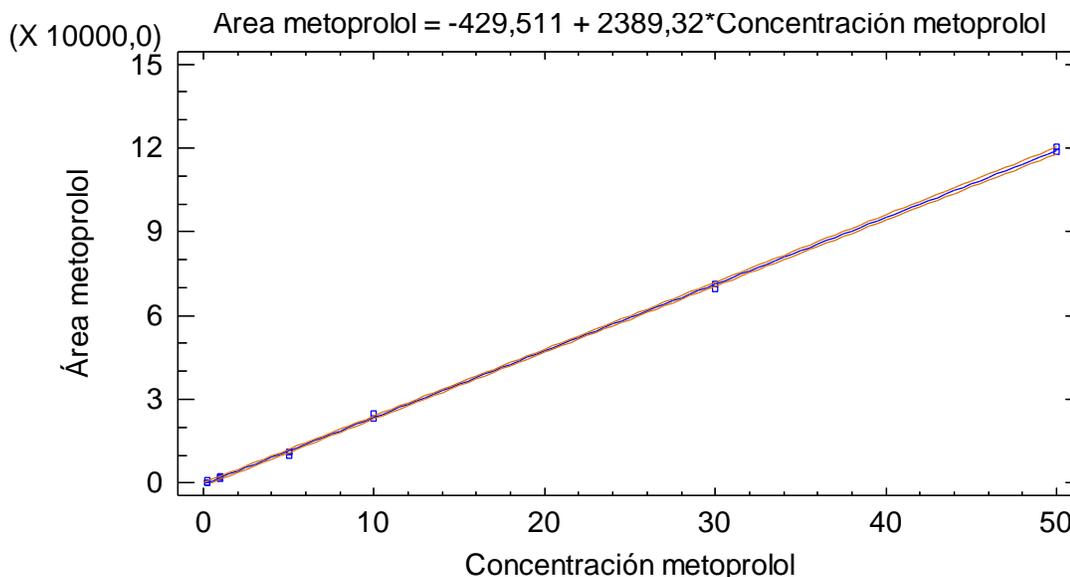


Gráfico 22. Gráfico del modelo ajustado para metoprolol.

Dado que el valor P (0,0000) en la tabla ANOVA es menor que el nivel de significancia de (0,05) se evidencia que existe una relación estadísticamente significativa entre el área de metoprolol y la concentración de metoprolol con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R- cuadrado indica que el modelo ajustado explica el 99,9558 % de la variabilidad en el área de ampicilina, y el coeficiente de correlación de 0,999779 indica una relación relativamente fuerte entre las variables.

Finalmente, se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para metoprolol y ambos supuestos se cumplieron, dado que el valor P obtenido fue mayor que el nivel de significancia, como se observa en los gráficos 23 y 24.

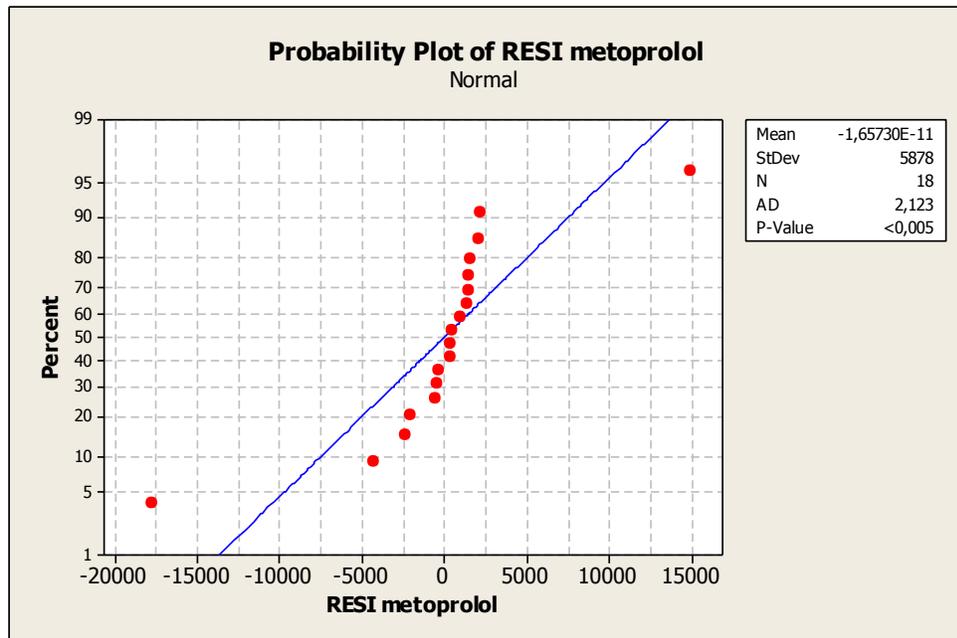


Gráfico 23. Gráfico de Normalidad para metoprolol.

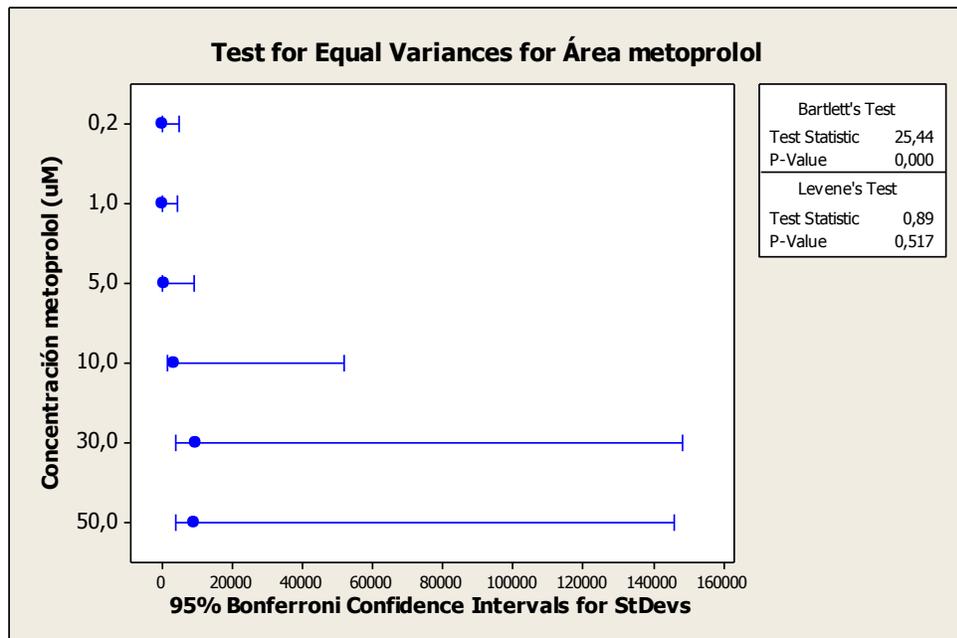


Gráfico 24. Gráfico de Homogeneidad de Varianzas para metoprolol.

Bajo lo anterior, se posee evidencia de que el método ofrece una respuesta lineal en el rango de concentración de 0,2 µM a 50 µM, el cual fue seleccionado de acuerdo al rango de concentración esperado en los ensayos de permeabilidad *in vitro*. Adicionalmente, se afirma que los resultados obtenidos son fiables ya que se

siguieron las pautas establecidas por la FDA en cuanto a la construcción de las curvas de calibración, preparación de los estándares, etc.; se verificó que el equipo UPLC estuviera en óptimas condiciones al momento de analizar los estándares; se empleó un software como Minitab® que es una de las herramientas estadísticas más reconocidas y utilizadas por compañías e instituciones de educación superior y, se realizó un cuidadoso y estricto manejo de los datos.

#### 8.2.4. Precisión y Exactitud

Los resultados obtenidos para la precisión y exactitud intra e inter día se muestran en las Tablas 12-17 y en la Tabla 18-19 respectivamente, siendo el coeficiente de variación (CV) la medida de precisión y el error relativo (ER) la medida de exactitud.

Tablas 12 y 13. Resultados precisión y exactitud (Día 1).

AMPICILINA SÓDICA			
Día 1			
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)	ER (%)
0,5		1,117	125,226
		1,110	
		1,126	
		1,130	
		1,148	
	X	1,126	
	S	0,015	
	<b>CV</b>	<b>1,298</b>	
20		17,244	-15,755
		16,654	
		16,798	
		16,717	
		16,833	
	X	16,849	
	S	0,231	
	<b>CV</b>	<b>1,373</b>	
40		37,293	-5,632
		38,240	
		37,827	
		36,985	
		38,391	
	X	37,747	
	S	0,603	

CV		1,596	
METOPROLOL TARTRATO			
Día 1			
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)	ER (%)
0,5		0,339	-24,729
		0,360	
		0,375	
		0,406	
		0,401	
	X	0,376	
	S	0,028	
	<b>CV</b>	<b>7,503</b>	
20		20,309	-0,205
		19,760	
		19,959	
		19,916	
		19,851	
	X	19,959	
	S	0,209	
	<b>CV</b>	<b>1,049</b>	
40		39,877	3,069
		42,613	
		41,331	
		39,503	
		42,814	
	X	41,228	
	S	1,520	

CV	3,688
----	-------

Tablas 14 y 15. Resultados precisión y exactitud (Día 2)

AMPICILINA SÓDICA			
Día 2			
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)	ER (%)
0,5		0,527	2,119
		0,532	
		0,524	
		0,493	
		0,477	
	X	0,511	
	S	0,024	
	CV	4,752	
	20		
		19,185	
		20,070	
		22,203	
		22,050	
X		20,679	
S		1,363	
CV		6,593	
40			42,272
		41,882	
		42,507	
		42,205	
		41,856	
	X	42,144	
	S	0,275	
	CV	0,653	

METOPROLOL TARTRATO			
Día 2			
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)	ER (%)
0,5		0,661	28,890
		0,423	
		0,866	
		0,709	
		0,562	
	X	0,644	
	S	0,166	
	CV	25,689	
	20		
		21,341	
		21,291	
		21,471	
		21,083	
X		21,332	
S		0,161	
CV		0,756	
40			41,562
		41,622	
		42,404	
		42,653	
		42,267	
	X	42,102	
	S	0,486	
	CV	1,154	

Tablas 16 y 17. Precisión y Exactitud (Día 3).

AMPICILINA SÓDICA			
Día 3			
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)	ER (%)
0,5		0,924	82,414
		0,928	
		0,940	
		0,875	
		0,892	
	X	0,912	
	S	0,027	
	<b>CV</b>	<b>2,977</b>	
20		20,665	2,934
		21,739	
		21,080	
		19,920	
		19,531	
	X	20,587	
	S	0,885	
	<b>CV</b>	<b>4,301</b>	
40		42,931	4,415
		40,539	
		40,718	
		41,589	
		43,053	
	X	41,766	
	S	1,188	
	<b>CV</b>	<b>2,845</b>	

METOPROLOL TARTRATO			
Día 3			
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)	ER (%)
0,5		0,723	11,335
		0,446	
		0,493	
		0,680	
		0,442	
	X	0,557	
	S	0,135	
	<b>CV</b>	<b>24,173</b>	
20		21,040	2,749
		20,289	
		21,114	
		20,399	
		19,908	
	X	20,550	
	S	0,515	
	<b>CV</b>	<b>2,508</b>	
40		40,898	1,783
		39,979	
		39,971	
		40,940	
		41,777	
	X	40,713	
	S	0,760	
	<b>CV</b>	<b>1,866</b>	

Tablas 18. Precisión y exactitud inter-día para ampicilina sódica.

PRECISIÓN Y EXACTITUD INTER-DÍA AMPICILINA SÓDICA		
(n = 15, 3 ensayos)		
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)
0,5	<b>Media</b> <b>CV</b> <b>ER (%)</b>	0,85 31,18 69,92
20	<b>Media</b> <b>CV</b> <b>ER (%)</b>	19,37 10,56 -3,14
40	<b>Media</b> <b>CV</b> <b>ER (%)</b>	40,55 5,39 1,38

Tablas 19. Precisión y exactitud inter-día para metoprolol.

PRECISIÓN Y EXACTITUD INTER-DÍA METOPROLOL TARTRATO		
(n = 15, 3 ensayos)		
Concentración teórica (uM)		Concentración determinada (uM)
0,5	<b>Media</b> <b>CV (%)</b> <b>ER (%)</b>	0,53 31,00 5,17
20	<b>Media</b> <b>CV (%)</b> <b>ER (%)</b>	20,61 3,20 3,07
40	<b>Media</b> <b>CV (%)</b> <b>ER (%)</b>	41,35 2,70 3,37

El parámetro de precisión se evaluó con el fin de determinar el grado de dispersión entre la respuesta obtenida para repeticiones de una misma muestra. De ésta forma, se realizaron 5 inyecciones de soluciones estándar de ampicilina y metoprolol con concentración de 0,5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  y posteriormente se calculó el coeficiente de variación por nivel de concentración.

Como se observa en las Tablas 12-19, la precisión se evaluó intra e inter-día con el fin de conocer la variación en los resultados cuando el método se aplica en un solo día y en días distintos.

Al observar los coeficientes de variación obtenidos por día de análisis, se evidencia que en los tres niveles de concentración se cumple (en su mayoría) con el criterio de aceptación establecido por la FDA, según la cual un método de analítico es preciso si el coeficiente de variación por nivel de concentración es menor o igual al 15%, o al 20% en el límite de cuantificación. No obstante, se encontró que en el segundo y tercer día de análisis, el coeficiente de variación para la concentración 0.5  $\mu\text{M}$  de metoprolol, superó el 15%. Lo anterior se atribuye a que esta concentración es la más baja y cercana al límite de cuantificación y por ende, la respuesta que genera es demasiado pequeña y sujeta a incertidumbre.

Cuando se analiza la precisión inter-día (promedio de los tres días de análisis) se evidencia nuevamente que el coeficiente de variación más alto se obtuvo para el nivel de concentración de 0,5  $\mu\text{M}$ , siendo de 31,18% para ampicilina y de 31,00% para metoprolol. En las concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  de ambos analitos, los coeficientes de variación no exceden el 15%.

Por otro lado, la exactitud del método se determinó al comparar la concentración obtenida para cada solución estándar con respecto a la concentración teórica de la misma. Según las pautas de la FDA, un método analítico es exacto si el promedio de concentración obtenido no es mayor al 15% del valor esperado, excepto en el límite de cuantificación, donde la desviación no debe ser mayor al 20%.

Los resultados de la exactitud intra- día, muestran que al analizar la concentración de analito de 0,5 $\mu\text{M}$ , se obtienen errores relativos muy superiores al 15%, mientras que en las concentraciones de 20 $\mu\text{M}$  y 40 $\mu\text{M}$ , los errores relativos cumplen con el criterio de aceptación. De igual forma, cuando se evaluó la

exactitud del método durante tres días de análisis, se observa que el mayor de error relativo (69%) se atribuye a la concentración baja de ampicilina, mientras que la concentración media presenta un error relativo solo del 3%, y la concentración alta, entre el 1- 3%.

En resumen, se evidencia que el método analítico desarrollado es preciso y exacto para la determinación de concentraciones medias y altas, debido a que tanto el coeficiente de variación como el error relativo cumplen con el criterio de aceptación fijado por la FDA para métodos bioanalíticos, no obstante, a concentraciones muy bajas la precisión y exactitud del método presenta limitaciones, porque la variación observada entre replicas de la misma muestra así como la desviación frente al valor teórico es relativamente alta. Cuando se presentan situaciones en las que el coeficiente de variación es alto en algunas concentraciones y bajo en otras, se hace necesario restringir el intervalo en el cual se realiza la curva de calibración, de manera que la precisión sea constante, o bien si no es posible disminuir el rango lineal, se debe hacer una regresión ponderada, que aunque no está dentro del alcance del presente proyecto, se tendrá presente como recomendación para la realización de trabajos posteriores (Pintos, 2009).

### **8.2.5. Estabilidad**

Se conoce que las penicilinas son compuestos altamente inestables debido a la facilidad con la que sufren hidrólisis del anillo betalactámico. Este tipo de reacciones son influenciadas por el pH y por tanto dependiendo del medio en el que se encuentren las penicilinas, se generaran distintos mecanismos y productos de degradación. En medio alcalino, las penicilinas se descomponen por la abertura de anillo betalactámico, dando lugar al ácido peniciloico. En medio ácido, el ataque electrófilo sobre el N (nitrógeno) betalactámico y sobre el S (azufre) tiazolidínico, hace que la ampicilina se hidrolice y de lugar al ácido penicilénico que es poco estable y se convierte rápidamente en ácidos penilico y peniciloico (Figura 4.). (Tico, 1987)

Se ha reportado que cuando la ampicilina se encuentra en disuelta en solución de dextrosa al 5%, aproximadamente el 10% se descompone luego de 4 horas de almacenamiento a 25°C y más del 15% después de haber permanecido almacenado por el mismo periodo a -20°C (Gennaro, 2000).

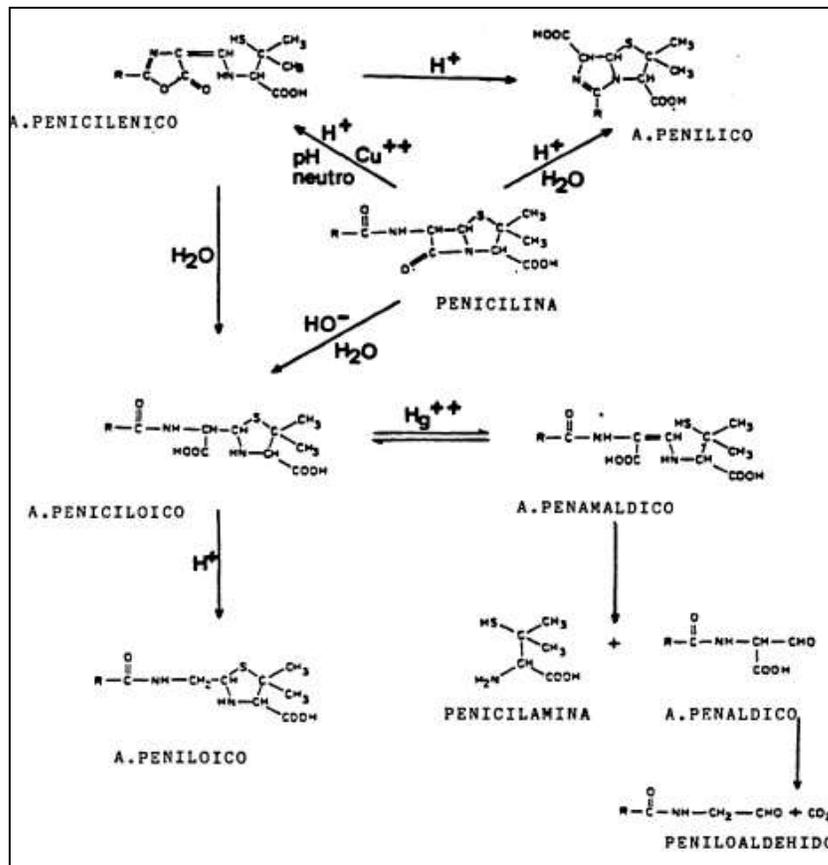


Figura 5. Mecanismo de degradación de penicilinas (Tico, 1987)

La estabilidad a corto plazo se evaluó con el fin de estimar el tiempo que pueden permanecer las muestras de ampicilina y metoprolol a temperatura ambiente, sin que se inicien procesos de degradación en las mismas. Para lo anterior, se dispusieron estándares con concentración de 0,5  $\mu M$ , 20  $\mu M$  y 40  $\mu M$  a 25°C por 4 y 8 horas, y se calculó la variación en el área de los picos a estos tiempos con respecto al área obtenida para las muestras frescas o recién preparadas.

Cabe mencionar que las muestras se analizaron a las 4 y 8 horas porque en promedio éste el tiempo que permanecen a 25°C en un día de trabajo normal.

Los resultados (resumidos en las Tablas 20 y 21) muestran que al transcurrir 4 horas, el área del pico de ampicilina en la concentración baja se redujo a la mitad del área inicial, siendo la pérdida incluso mayor en las concentraciones media y alta. Al finalizar las 8 horas, se evidencia que las áreas de ampicilina, en los tres niveles de concentración, disminuyeron entre un 80-90% del área inicial.

Al analizar el comportamiento del metoprolol, se observa que aunque las áreas en los tres niveles de concentración disminuyeron con respecto al valor inicial, no lo hicieron en la misma magnitud que ampicilina, pues transcurridas las 8 horas, las áreas de metoprolol se desvían en un 4-5% del área inicial.

Tabla 20. Tabla resumen de estabilidad a corto plazo para ampicilina sódica.

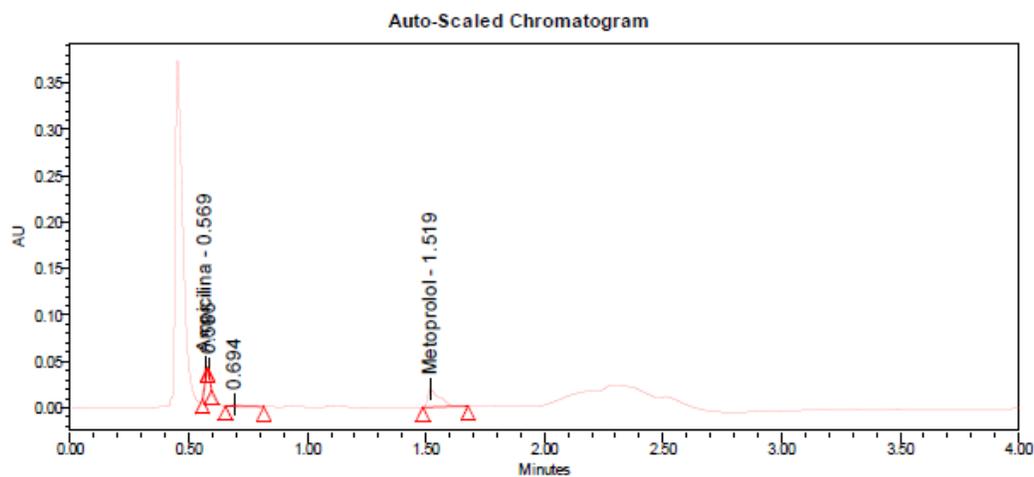
AMPICILINA SÓDICA							
Concentración	Basal	4h	8h	Promedio	S	CV (%)	CV (%)
0,5 µM	3294	1089	531	1638,000	1461,025	89,196	
	3313	1112	538	1654,333	1464,838	88,546	88,999
	3281	1077	533	1630,333	1455,166	89,256	
20 µM	89406	13092	No determinada*	51249,000	53962,147	105,294	
	86282	13545	86816	62214,333	42149,725	67,749	80,513
	90218	13339	87472	63676,333	43615,026	68,495	
40 µM	188976	44073	38523	90524,000	85307,080	94,237	
	187241	43214	37179	89211,333	84949,791	95,223	94,435
	190017	44187	39437	91213,667	85599,151	93,845	

\*No se incluye este dato porque el pico de ampicilina se encuentra partido y por tanto el equipo le reporta dos valores de área (8033 y 8170).

Tabla 21. Tabla resumen de estabilidad a corto plazo para metoprolol.

METOPROLOL TARTRATO							
Concentración	Basal	4h	8h	Promedio	S	%CV	CV (%)
0,5 µM	2227	681	548	1152,000	933,349	81,020	
	1552	613	509	891,333	574,512	64,455	88,932
	2807	592	135	1178,000	1429,141	121,319	
20 µM	61105	68540	66336	65327,000	3818,817	5,846	
	60720	66561	62541	63274,000	2988,693	4,723	5,353
	60580	67601	63812	63997,667	3514,180	5,491	
40 µM	117917	127768	125318	123667,667	5128,669	4,147	
	118088	130152	126326	124855,333	6164,995	4,938	4,507
	120298	128913	130862	126691,000	5621,609	4,437	

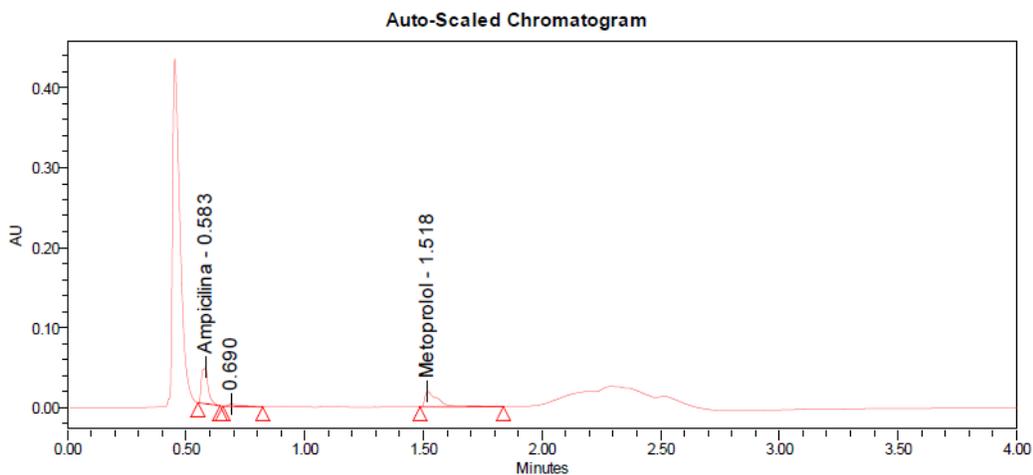
A continuación se muestran algunos cromatogramas obtenidos al determinar la estabilidad a corto plazo:



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Ampicilina	0.569	13339	19042	6.647	uM
2		0.586	4260	8904		
3		0.694	9225	2270		
4	Metoprolol	1.519	67801	19669	50.866	uM

Gráfico 25. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica y metoprolol tartrato 20 $\mu$ M, después de transcurridas 4 horas.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Ampicilina	0.583	87472	46042	43.197	uM
2		0.690	9760	2598		
3	Metoprolol	1.518	77317	19305	58.035	uM

Gráfico 26. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina y metoprolol 20 $\mu$ M, después de transcurridas 8 horas.

Al evaluar la estabilidad post-preparativa o estabilidad en el automuestreador después de 6, 12 y 24 horas (Tablas 22 y 23), se observa que en la concentración baja de ampicilina, el área del pico se redujo en promedio un 60% con respecto al área inicial mientras que en las concentraciones media y alta no fue posible medir con certeza el área del pico porque éste no es totalmente definido, se observa partido y se integran dos valores de área para el mismo. Adicionalmente, se observa picos cercanos al tiempo de retención de ampicilina (aproximadamente a 0.690 min), que no estaban presentes en las muestras frescas y que podrían ser indicio de procesos de descomposición del analito.

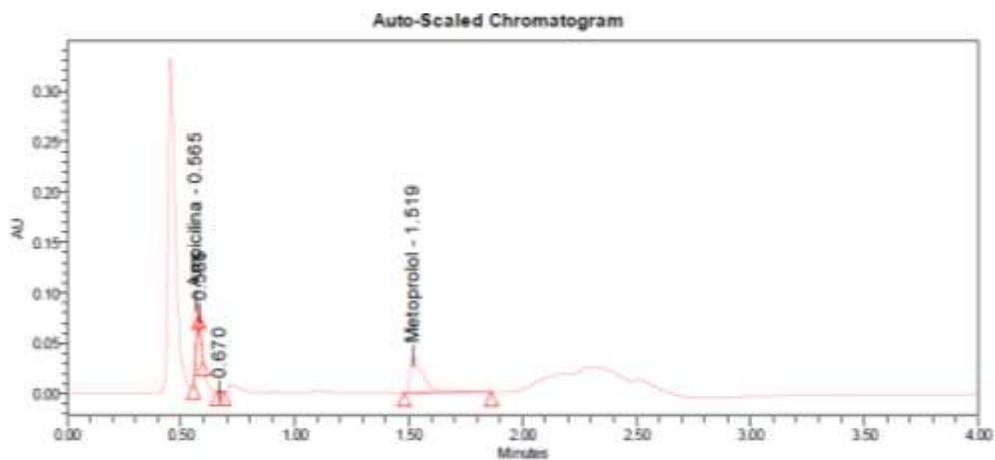
Por su parte, el metoprolol presentó una disminución en el área menor que la de ampicilina aún después de finalizadas 24 horas. No obstante debe resaltarse que conforme transcurre el tiempo, el pico de metoprolol se ensancha y presenta coileo (extensión del área) lo cual conduce a que la integración del área esté sujeta a error, pues es difícil determinar donde finaliza el pico y hasta qué punto refleja con certeza la concentración de analito presente.

Tabla 22. Tabla resumen de estabilidad post-preparativa para ampicilina sódica.

AMPICILINA SÓDICA								
Concentración	Basal	6h	12h	24h	Promedio	S	CV (%)	CV (%)
0,5 µM	2490	705	693	649	1296,000	1034,052	79,788	
	2452	687	730	679	1289,667	1006,840	78,070	79,115
	2542	674	762	681	1326,000	1054,006	79,488	
20 µM	88596	El pico se encuentra partido y al integrarse se le reportan dos valores de área.						
	85450							
	86218							
40 µM	195643	El pico se encuentra partido y al integrarse se le reportan dos valores de área.						
	200701							
	198497							

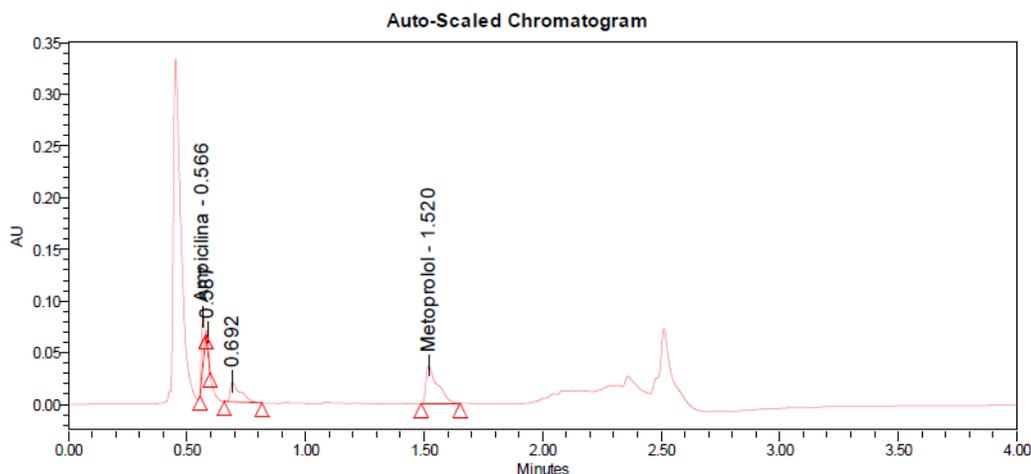
Tabla 23. Tabla resumen de estabilidad post-preparativa para el metoprolol.

METOPROLOL								
Concentración	Basal	6h	12h	24h	Promedio	S	CV (%)	CV (%)
0,5 $\mu$ M	1426	573	595	753	864,667	486,253	56,236	
	1491	526	560	711	859,000	547,592	63,748	63,685
	1536	449	550	462	845,000	600,551	71,071	
20 $\mu$ M	60941	57121	61402	61901	59821,333	2349,889	3,928	
	59305	59337	62211	63499	60284,333	1668,619	2,768	3,092
	59900	62423	63662	62700	62171,250	1604,563	2,581	
40 $\mu$ M	119259	120436	123156	121288	120950,333	1998,764	1,653	
	127412	117290	121024	120033	121908,667	5118,662	4,199	2,516
	123593	119730	122951	120828	122091,333	2070,015	1,695	



Peak Results					
Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1 Ampicilina	0.565	39943	55650	19.754	$\mu$ M
2	0.565	8636	18535		
3	0.670	195	220		
4 Metoprolol	1.519	140949	36210	104.984	$\mu$ M

Gráfico 27. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica y metoprolol tartrato 40  $\mu$ M, después de 6 horas.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Ampicilina	0.566	40153	50971	19.867	uM
2		0.587	8562	17264		
3		0.692	56479	19372		
4	Metoprolol	1.520	121913	36705	90.939	uM

Gráfico 28. Cromatograma obtenido para estándar de ampicilina sódica y metoprolol tartrato 40  $\mu\text{M}$ , después de 24 horas.

Se evaluó la estabilidad de los analitos al someterlos a ciclos de congelación y descongelación, encontrándose que conforme aumenta el número de ciclos, el área y por ende concentración de los analitos disminuye. De modo que finalizados los tres ciclos, el área de ampicilina disminuyó un 75% para la concentración baja y un 12 y 15% para las concentraciones media y alta. En el caso del metoprolol, la concentración más baja presento el coeficiente de variación más alto (95%) mientras que las concentraciones media y alta obtuvieron valores de 7% y 8%. Así, aunque se pueden someter los analitos a ciclos de congelación y descongelación sin que se presente una degradación significativa (en las concentraciones media y alta), se recomienda que los estándares se preparen y analicen rápidamente, o en caso de no ser posible se sometan al menor número de ciclos para obtener resultados más fiables (principalmente en concentraciones bajas).

Finalmente, se determino la estabilidad a largo plazo de los analitos, tras someter estándares de concentración baja, media y alta, a congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante 15 días. Debe mencionarse, que es importante determinar este tipo de estabilidad porque ello permite predecir que tan oportuno es conservar y posteriormente

utilizar muestras que han sido almacenadas por periodos de tiempo extensos en el congelador.

Al analizar los resultados (Tabla 24), se observa que aunque hubo una disminución en el área de ampicilina y metoprolol a los tres niveles de concentración, claramente la variación respecto al área inicial es mucho menor que la obtenida a temperatura ambiente en un intervalo de 8 horas, lo cual resulta razonable dado que en el estado de congelación se retardan las reacciones de degradación.

Así, aunque la congelación de las muestras es una alternativa para conservar las muestras y disminuir el riesgo de descomposición, se sugiere que los tiempos de congelación no deben ser muy prolongados, al menos en el caso de la ampicilina, por que como se observa, finalizados los 15 días de almacenamiento, se ha perdido entre el 20 y 60% de la concentración inicial. A continuación, se muestran algunos cromatogramas obtenidos para este tipo de estabilidad.

Tabla 24. Resultados estabilidad a largo plazo.

AMPICILINA SÓDICA						
Concentración	Basal	Media	Final	Media	Recuperación relativa al basal (%)	CV (%)
0,5 µM	3230		2778			
	3248	3259,67	2237	2266,00	69,52	22,78
	3301		1783			
20 µM	92190		20153			
	97029	94426,33	19800	19766,67	20,93	71,67
	94060		19347			
40 µM	192532		45894			
	181750	185613,67	48723	46802,67	25,22	65,51
	182559		45791			
METOPROLOL TARTRATO						
Concentración	Basal	Media	Final	Media	Recuperación relativa al basal (%)	CV (%)
0,5 µM	1289		453			
	527	824,00	544	515,00	62,50	46,36
	656		548			
20 µM	57187		60811			
	55120	56565,67	62212	62088,33	109,76	5,43
	57390		63242			
40 µM	111822		112901			
	109294	110128,67	123130	118453,00	107,56	4,98
	109270		119328			

Los resultados obtenidos para los distintos tipos de estabilidad permitieron conocer las condiciones y periodos de tiempo a los que deben someterse los analitos con el fin de asegurar que los resultados obtenidos sean fiables y no el resultado de patrones de degradación. Así se tiene que las soluciones de ampicilina y metoprolol no deben ser expuestas a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo porque se observó que al transcurrir 4 horas, la concentración de los analitos se ha reducido a la mitad o más de la concentración inicial, por tanto se sugiere que lo más viable es analizar las muestras una vez han sido preparadas o bien mantenerse refrigeradas (-20°C) hasta el momento de análisis, debido a que a ésta temperatura se retrasan o enlentecen los procesos de degradación.

### **8.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

En la Universidad Icesi se desarrollaron tres ensayos de permeabilidad *in vitro* con células Caco-2, en los que se evaluó la permeabilidad de 4 sistemas a 7 intervalos de tiempo: 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 150 min.

Sistema 1: ampicilina y metoprolol (referente de permeabilidad)

Sistema 2: ampicilina+PAM-18 Na y metoprolol

Sistema 3: ampicilina+PAM-18 Na

Sistema 4: metoprolol+PAM-18Na

En dichos ensayos se obtuvieron más de 300 muestras y el objetivo fue utilizar el método desarrollado para cuantificar la fracción permeada de ampicilina y metoprolol en los distintos sistemas.

Para analizar las muestras, se estableció primero un orden de análisis. De este modo, se inició el primer día con el sistema 1 de los tres ensayos, al día siguiente con el sistema 2 de los tres ensayos y así sucesivamente. Antes de llevarse al UPLC, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se tomó 0.5 ml de las muestras y se filtraron por membranas de 0.22µM. También debe mencionarse que a lo largo del análisis se realizaron inyecciones de control (estándares de ampicilina y metoprolol) con el fin de verificar el correcto funcionamiento del equipo y el mantenimiento de parametros como el tiempo de retención, áreas, forma o aspecto del pico, etc.

Aunque no está dentro del alcance del proyecto, interpretar los resultados arrojados por el equipo, se mostrarán algunos cromatogramas que evidencian que fue posible la identificación y cuantificación de los dos analitos en las muestras.

Los cromatogramas que se exhiben abajo corresponden a los obtenidos para muestras que contenían los dos analitos y además el sistema polimérico PAM- 18 Na, observándose que conforme transcurre el tiempo la fracción permeada de los analitos incrementa, y el método analítico está en capacidad de detectar y cuantificar dichas variaciones.

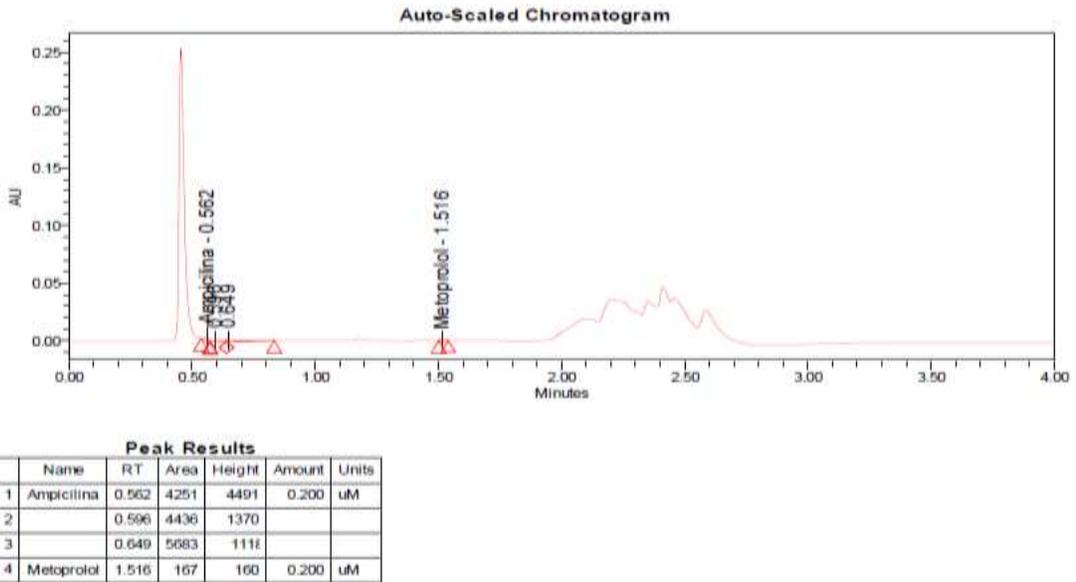


Gráfico 29. Cromatograma obtenido para réplica del Ensayo 1- Sistema 2- Tiempo 30 min.

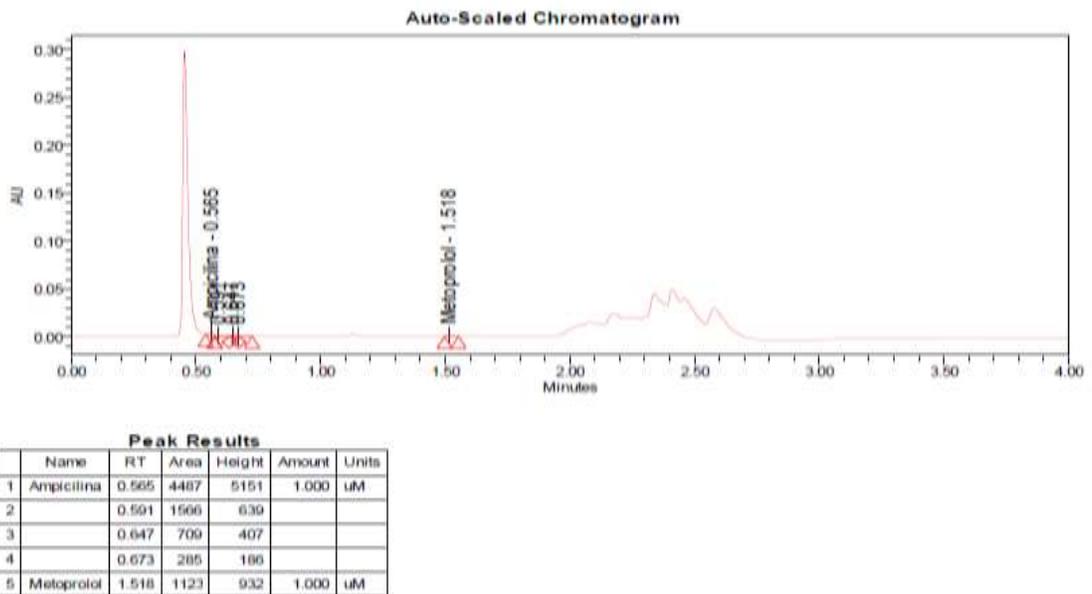
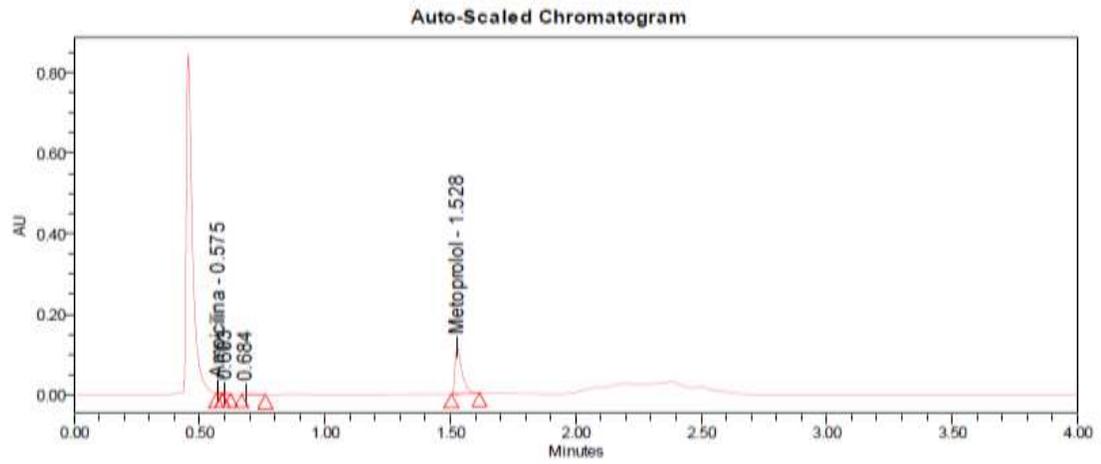


Gráfico 30. Cromatograma obtenido para réplica del Ensayo 1- Sistema 2- Tiempo 60 min.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Ampicilina	0.575	3634	7179	1.861	uM
2		0.603	840	959		
3		0.684	1303	687		
4	Metoprolol	1.528	220647	115925	163.787	uM

Gráfico 31. Cromatograma obtenido para réplica del Ensayo 1- Sistema 2- Tiempo 120min.

## 9. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una metodología analítica empleando la técnica UPLC que permite la identificación y cuantificación simultánea de los activos ampicilina y metoprolol en una matriz biológica obtenida en ensayos de permeabilidad *in vitro* con células Caco-2.
- Se obtuvo una metodología analítica validada de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Food and Drug Administration para la Validación de Métodos Bioanalíticos, por lo cual se asegura que el método cumple con los parámetros de selectividad, linealidad, precisión y exactitud.
- Se implementó el método analítico para el análisis de muestras obtenidas en ensayos de permeabilidad *in vitro* realizados en la Universidad Icesi y los resultados obtenidos demuestran que el método es aplicable y que garantiza resultados reproducibles.
- El método analítico desarrollado se convierte en una herramienta útil para el análisis rutinario de principios activos en matrices biológicas y además impulsa el desarrollo de nuevos métodos para la evaluación de analitos combinados con otros sistemas poliméricos como son el PAM 18-K o el Eudragit®.

## 10. RECOMENDACIONES

Dado que a concentraciones muy bajas (cercanas a 0,5  $\mu\text{M}$ ), la exactitud y precisión del método demuestra limitaciones, se sugiere realizar una regresión ponderada de los datos con el fin de que el método cumpla la especificación establecida por la FDA para métodos bioanalíticos, según la cual el coeficiente de variación entre réplicas y el error frente al valor nominal debe ser inferior al 20 %.

Se recomienda que para próximos ensayos, se restrinja el intervalo en el cual se realiza la curva de calibración, de manera que la precisión sea constante, para que así no haya necesidad de realizar posteriormente una regresión ponderada de los datos.

Continuar con el desarrollo de metodologías analíticas aplicables a ensayos de permeabilidad in vitro, que permitan evaluar el efecto de los diferentes sistemas poliméricos (estudiados por el grupo de investigación en fisicoquímica farmacéutica) en el mejoramiento de las propiedades farmacocinéticas y así obtener a futuro resultados prometedores en el campo biofarmacéutico.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aki, H. et al. (2009). Effect of pH on the formation of inclusion complexes between  $\beta$ -lactam antibiotics and 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 95, (2), pp. 421-426.
2. Armenta, S. et al. *Green Analytical Chemistry*. (2008). *Trends in Analytical Chemistry*, 27, (6), pp. 497-511.
3. Ashnagar, A. & Gharib.N.(2007). Analysis of Three Penicillin Antibiotics (Ampicillin, Amoxicillin and Cloxacillin) of Several Iranian Pharmaceutical Companies by HPLC. *E-Journal of Chemistry*, 4 (4), pp.536-545.
4. Castillo, R. et al. Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 35, (2), pp.177-191.
5. Escudero, E. et al. (2002). Pharmacokinetics of an ampicillin/sulbactam (2:1) combination in rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*, 25, (4), pp. 259-264.
6. Food and Drug Administration. (2001). Guidance for the industry. Bioanalytical method validation.
7. Forbes, B. (2003). The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, pp. 161-167.
8. Gamba.V.& Dusi, G. Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization. *Analytica Chimica Acta*, 483, pp. 69–72.
9. Garg, G. (2008). Spectrophotometric and Column High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Simultaneous Estimation of Metoprolol Tartrate and Hydrochlorothiazide in Tablets. *Journal of AOAC International*, 91, (5), pp. 1045-105.
10. Gennaro, A. (Ed.) (2000). Remington Farmacia. Uruguay: Montevideo.
11. International Conference on Harmonization (2005). Validation of Analytical Procedures.
12. Lafforgue, G. et al. (2008). Oral absorption of ampicillin: role of paracellular route vs. PepT1 transporter. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 22, (2), pp. 189-201.
13. Marín, M. & Gudiol, F. (2002). Antibióticos Betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas de Microbiología Clínica*, 21, (1), pp. 42-55.
14. Marzo, A. et al. High-performance Liquid Chromatography assay of ampicillin and its prodrug lenampicillin. *J. Chromatogr. B*. 1990, 507, 235.

15. Mirelis, B. & Gurguí, M. (2006). Medicamentos Antibacterianos. En Ausina, V. & Moreno, S. (Ed.): Tratado SEIMC de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Farmacología Básica y Clínica, pp. 97-102. Madrid.
16. Mizuma, T. et al. (2005). Simultaneous HPLC Assay of Lenampicillin (Ampicillin Prodrug), Ampicillin, and Marker Compound for High-Throughput in Vitro Assessment of Intestinal Absorption and Metabolism Using Caco-2 Cells. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, (10), pp.1531-1537.
17. Montoya, G. (2012). La columna y química de las fases estacionarias. Consideraciones cromatográficas en el análisis fitoquímico, pp.1-26
18. Neubert, R. (1989). Ion Pair Transport Across Membranes. *Pharmaceutical Research*, 6, (9), pp. 73-74.
19. Oltra, D. (2010). Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudio *in vitro* e *in Situ*. Universitat De València. Valencia.
20. Ortíz, R. et al. (2002). Amoxicillin and ampicillin are not transferred to gastric juice irrespective of *Helicobacter pylori* status or acid blockade by Omeprazol. *Aliment Pharmacol Ther.*, 16, pp.1163–1170.
21. Pencheva, I. (2013). Analytical study of UV-Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneously determination of metoprolol and hydrochlorothiazide in fixed dosage combinations. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5, (7), pp. 104-108.
22. Pintos, M. (2009). Técnicas Experimentales. Física. Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: <http://www.eduteka.org/gestorp/recUp/7dbc1f041fb07751bda5515759cd930c.pdf>.
23. Quetglas, E.G. & Azanza, J.R. (2009). Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En Lorenzo, P. et al. (Ed.): Farmacología Básica y Clínica. pp. 805-812. Madrid.
24. Regardh, C. et al. (1980). Clinical Pharmacokinetics of Metoprolol. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 9, pp. 518-519.
25. Saitoh, H. et al. (2002). In vitro permeation of  $\beta$ -lactam antibiotics across rat jejunum and its correlation with oral bioavailability in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 54, (4), pp. 445-448.
26. Salamanca, C.H. et al. (2005). Hydrophobically modified polyelectrolytes as potential drugs reservoirs of N- alkyl-nitroimidazoles. *J. Chil.Chem. Soc.*, 52.
27. Sierra, I. et al. (2010). Análisis Instrumental. España: La Coruña.
28. Skoog, et al. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Madrid: Aravaca.
29. Snyder, L. et al. (2010). Introduction to Modern Liquid Chromatography. New Jersey.

30. Suárez, C. & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 27, (2), pp.116-129.
31. Swartz, M.E. (2005). *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction*, pp.8-14.
32. Tawakkul, M. A. et al. (2010). Development and application of a validated stability-indicating Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) method for the determination of dantrolene and its related impurities. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 27,(1), pp. 21–29.
33. USP 31-NF 26. (2008). Capítulo 1225: Validación de Métodos Compendiales.
34. Yoon, I. et al. (2010). Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol. *Xenobiotica*, 41, (3), pp. 243-251.