

T
269

84456

FIRMA DE CONFORMIDAD DEL COMITÉ TUTORIAL



*TUTOR
DR. C. TOMAS QUIRINO BARREDA*



*ASESORA
DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO*



*ASESOR
DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO*

COLEGIO DE ESTUDIOS
UNIVERSITARIOS
DE LA CIUDAD DE
MEXICO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
PÚBLICA
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
PÚBLICA
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
PÚBLICA

AGRADECIMIENTOS:

A LA VIDA POR TODOS LOS REGALOS Y SATISFACCIONES QUE ME HA OTORGADO.

A LOS PROFESORES DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS; EN ESPECIAL A:

A LA M. EN C. ALMA ROSA CORTÉS, LA DRA. CLAUDIA SOTO Y LA DRA. LAURA CASTRILLÓN POR SU INTERÉS, DEDICACIÓN Y TIEMPO QUE INVIERTEN EN LA FORMACIÓN DE SUS ALUMNOS.

A MIS ASESORES:

DR. TOMÁS QUIRINO, DRA. RAQUEL LÓPEZ Y DR. GUSTAVO VALENCIA; PORQUE SIN SU VALIOSA AYUDA NO HABRÍA SIDO POSIBLE LA REALIZACIÓN DE ÉSTE TRABAJO.

AL JURADO:

A EL M. EN C. ARMANDO CERVANTES Y DR. OCTAVIO CARREÓN, POR LA AMISTAD QUE ME HAN BRINDADO, Y PORQUE SON UN EJEMPLO A SEGUIR POR SU GRAN CALIDAD HUMANA Y PROFESIONAL.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN1
II. MARCO DE REFERENCIA	
<i>A. LIOFILIZACIÓN DE MEDICAMENTOS</i>2
<i>B. ETAPA DE CONGELACIÓN</i>3
a) Grados de superenfriamiento5
b) Nucleación6
1.1 <i>Nucleación homogénea</i>6
1.2 <i>Nucleación heterogénea</i>7
1. <i>Crecimiento de los Cristales de Hielo</i>8
a) Influencia de las sustancias Disueltas8
b) Soluciones Complejas8
c) Descongelación8
2. <i>Textura del Producto Congelado</i>9
a) Textura resultante9
b) Solidificación del estado amorfo9
<i>C. SECADO PRIMARIO</i>12
1. <i>Influencia del Espesor del Producto</i>13
2. <i>Transferencias de Calor</i>13
a) Transferencias internas13
b) Influencia de la textura porosa14
c) Transferencias Externas de Calor14
3. <i>Temperatura de la Zona Porosa</i>15
a) Desmoronamiento de la estructura15
b) Condiciones de presión17
<i>D. SECADO SECUNDARIO</i>17
<i>E. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN</i>18
<i>F. ASPECTO CORRECTO DEL LIOFILIZADO</i>18
<i>G. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y FARMACOLOGICAS DE LA VANCOMICINA</i>19
1. <i>Vancomicina Clorhidrato, Materia Prima</i>19
a) Fórmula molecular19
b) Peso molecular19
c) Fórmula desarrollada19
d) Nombre químico20
e) Conservación20

f) Solubilidad20
g) Punto de fusión20
2. Producto Terminado20
a) Descripción20
b) Propiedades farmacológicas20
1.1. Química20
1.2. Absorción, distribución y excreción20
1.3. Vías de administración y dosis20
1.4. Usos terapéuticos20
H. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS AL ANÁLISIS CRISTALOGRAFICO DE MATERIAS PRIMAS Y MEDICAMENTOS21
1. Microscopía Óptica21
a) Generalidades21
b) Descripción21
2. Microscopía Electrónica de Barrido22
a) Generalidades22
b) Importancia22
c) Descripción24
3. Espectrofotometría Infrarroja21
a) Descripción25
b) Infrarrojo cercano28
4. Difracción de rayos X29
a) Ley de Bragg30
b) Método del polvo cristalino32
c) Interpretación de los diagramas de difracción32
5. Calorimetría Diferencial de Barrido33
a) Termogravimetría33
b) Análisis térmico diferencial34
c) Calorimetría diferencial de barrido34
6. Espectrofotometría UV-Visible36
7. Opalinidad39
8. Tiempo de Reconstitución39
I. CRITERIOS DE CALIDAD DEL PRODUCTO LIOFILIZADO40
1. Especificaciones y normas40
a) Apariencia de la pastilla40
b) Velocidad de reconstitución40
c) Valoración40
d) Contenido de agua40
e) pH40
f) Solubilidad y transparencia de la solución40
g) Identificación40
h) Esterilidad40
i) Pirógenos40
j) Seguridad40

III. DELIMITACION DEL PROBLEMA	...41
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO	...42
V. OBJETIVOS	...42
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL	...43
<i>A. MATERIALES Y EQUIPO</i>	...43
1. <i>Reactivos y Materiales</i>	...43
2. <i>Equipo</i>	...43
<i>B. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</i>	...44
1. Descripción de Métodos	...44
a) Identificación y caracterización de las materias primas	...44
1.1 <i>Espectroscopia infrarroja</i>	...44
1.2 <i>Comportamiento térmico</i>	...44
1.3 <i>Cristalinidad y morfología</i>	...44
1.4 <i>Velocidad de reconstitución</i>	...45
1.5 <i>Opalinidad</i>	...45
1.6 <i>Valoración microbiológica de vancomicina</i>	...46
1.7 <i>Apariencia del taquete (pastilla) liofilizado</i>	...49
1.8 <i>Contenido de agua por Karl-Fisher</i>	...49
1.9 <i>Determinación del pH de la sol. reconstituida</i>	...49
1.10 <i>Determinación de la absorbancia a 200 y 289 nm</i>	...49
2. Fases Experimentales	...50
2.1 <i>Etapa 1. Control de calidad de las materias primas</i>	...50
2.2 <i>Etapa 2. Diseño estadístico</i>	...50
2.2 <i>Etapa 3. Análisis de los liofilizados del diseño experimental</i>	...52
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	...53
1. <i>Resumen de resultados</i>	...54
2. <i>Resultados estadísticos</i>	...56
a) <i>Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la opalinidad</i>	...56
b) <i>Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la valoración</i>	...58
c) <i>Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la cristalinidad</i>	...61
d) <i>Análisis estadístico del efecto de los factores sobre el número de capas</i>	...63
e) <i>Análisis estadístico del efecto de los factores sobre el tiempo de reconstitución</i>	...65
f) <i>Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la absorbancia a 280 nm</i>	...67

g) Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la temperatura de fusión en DSC70
--	--------

VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS72
---	--------

IX. BIBLIOGRAFIA

APÉNDICE A *Calificación de un equipo de liofilización*

APÉNDICE B *Diagrama de la liofilizadora*

APÉNDICE C *Apariencia de las muestras (fotografías)*

APÉNDICE D *Gráficas de comportamiento de las muestras*

APÉNDICE E *Termogramas de las muestras*

APÉNDICE F *Gráficas de NIR*

APÉNDICE G *Fotografías de cristalinidad*

APÉNDICE H *Espectros del infrarrojo lejano*

APÉNDICE G *Espectros de la absorbancia a 200 nm y 280 nm*

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA FARMACÉUTICA
CARRERA DE FARMACIA
CARRERA DE FARMACIA

I. INTRODUCCIÓN

Es evidente la necesidad que tiene nuestro país de nuevos productos farmacéuticos que ayuden de una mejor forma a reestablecer y/o mantener la salud de la población, esto explica el constante cambio y actualización de las políticas de calidad en la Industria Farmacéutica, a nivel mundial y nacional.

En nuestro país se comercializan una gran cantidad de productos farmacéuticos liofilizados, pero en realidad pocos laboratorios en México cuentan con plantas que realicen este proceso de liofilización; así la mayor parte de los productos liofilizados se elaboran en filiales de ellas en otro país y únicamente son distribuidos por la filial mexicana. Esto se debe probablemente a la gran infraestructura y costo que implica el proceso de liofilización.

Al considerarse que en México se a trabajado e investigado poco sobre el desarrollo de productos liofilizados y, que la mayor parte de la bibliografía a este respecto indica que los principales avances en materia de liofilización se han hecho, hasta la fecha, en otros países, fue que se tomo este tema de estudio para el presente trabajo de investigación de nivel maestría.

En este sentido, este trabajo se originó con la idea de resolver un problema práctico de la industria farmacéutica nacional, por los problemas de calidad que presentan los productos comercializados de clorhidrato de vancomicina liofilizada de 500 mg, principalmente en cuanto a: 1) aspecto del liofilizado (uniformidad del color del taquete o pastilla) y 2) opalinidad (característica que es función de la solubilidad del total de los componentes de la formulación); para ello se evaluó el impacto que tiene el congelamiento, la sublimación, el secado secundario y la presencia de soporte sobre el producto terminado; mediante un diseño factorial 2^4 .

Los resultados de este estudio mostraron que los factores con más influencia sobre: opalinidad, humedad, velocidad de reconstitución, valoración, aspecto del liofilizado, color, cristalinidad y número de capas del taquete; evaluados en el clorhidrato de vancomicina liofilizada fueron la tasa de congelamiento y la tasa de sublimación (en ambos casos a sus niveles de factor bajos).

Este trabajo permitió así mismo, demostrar la utilidad del diseño de experimentos en el desarrollo de productos farmacéuticos liofilizados y para resolver un problema de calidad del clorhidrato de vancomicina liofilizada.

II. MARCO DE REFERENCIA

A. LIOFILIZACIÓN DE MEDICAMENTOS

La liofilización o secado por congelación es el proceso mediante el cual un disolvente, normalmente agua, es removido de una solución congelada, mediante sublimación. Esta técnica de secado se puede aplicar cuando un compuesto químico o biológico es química, biológica y térmicamente inestable en las condiciones normales de almacenamiento. Por consiguiente, el propósito de la liofilización es conseguir estabilizar una formulación farmacéutica y aumentar su vida de anaquel. (Jennings, 1999)

La liofilización como operación unitaria es un proceso de estabilización y se puede dividir en tres etapas las cuales se observan en la *figura 1*. El paso inicial es una congelación de la formulación, a continuación la cantidad de disolvente es disminuida por sublimación (secado primario) y posteriormente por desorción (secado secundario) (Fernández, 1998, Jennings, 1999). Así, la liofilización es una operación de multietapas en la cual cada paso es crítico, y cada una de las etapas deberá estar bajo un estricto control para garantizar el éxito de toda la operación. (Reyes, 1999)

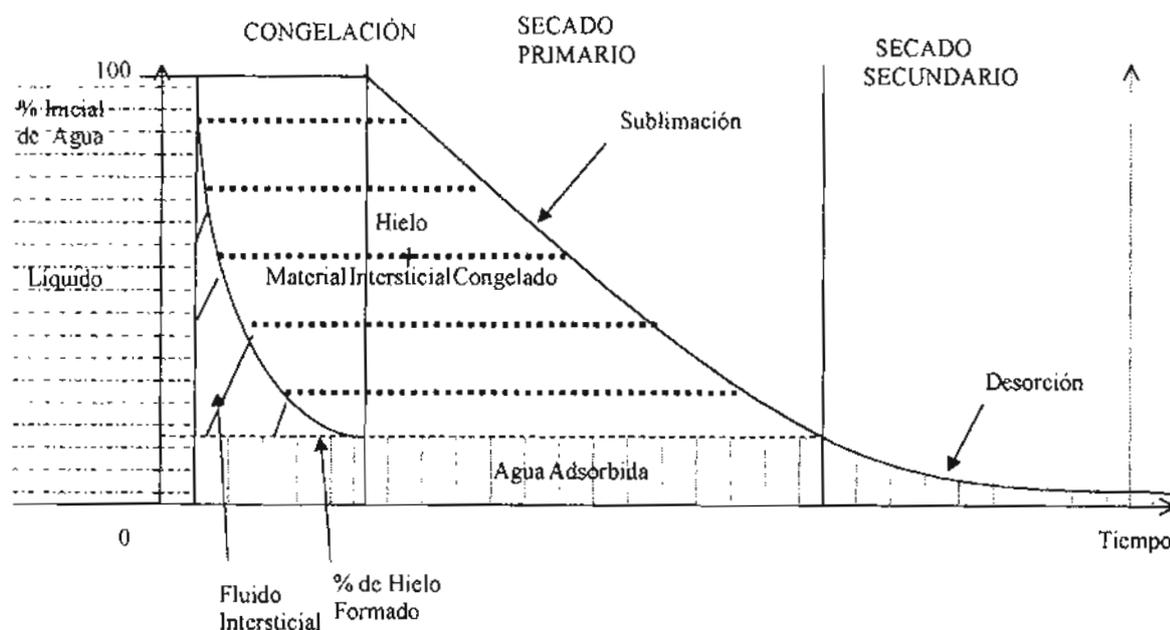


Fig. 1 Evolución esquemática del proceso de Liofilización.

En la elaboración de productos por liofilización, se parte de una solución que para el caso específico de productos farmacéuticos, se denomina formulación. Esta es un sistema que contiene un disolvente (usualmente agua) y un principio activo (p.a.), aunque en ocasiones son adicionados otros excipientes, ya sea para estabilizar al p.a., por razones terapéuticas o para conseguir un correcto formado del taquete (pastilla); por lo general está contenida en frascos viales, cerrados parcialmente con un tapón con ventana (ranurado), los cuales se someten a un proceso de congelamiento a temperatura entre 5° y 10°C por debajo del punto eutéctico del p.a. o mezcla a liofilizar. Posteriormente, se aplica vacío y se inicia una etapa de calentamiento, lo cual provee la energía necesaria para la sublimación o

secado primario, de donde se elimina alrededor del 90% del agua total y, finalmente, se procede a realizar un aumento de la temperatura -la cual depende del producto- para conseguir el secado secundario y el contenido de humedad final del liofilizado. (Fernández, 1998, Pikal, 1984 y Jennings, 1999)

Los factores más importantes que afectan las características y propiedades del producto liofilizado (morfología, cristalinidad, actividad biológica y reconstitución), son las propiedades coligativas de la mezcla de los ingredientes activos y del o los excipientes que componen la formulación (soportes, solución amortiguadora, antioxidantes, entre otros), así como las condiciones de la etapa de congelación, de la velocidad de liofilización (sublimación), de los cambios de temperatura en todas las etapas del proceso y del contenido de humedad de la pastilla liofilizada. (Fernández, 1998)

De tal forma, que para diseñar y optimizar los ciclos del liofilizado de un producto en particular, es necesario identificar los factores más importantes que tienen influencia sobre cada una de las etapas de dicho proceso. (Pikal, 1984)

B. ETAPA DE CONGELACIÓN

Durante la primera etapa del ciclo de liofilización -de congelación- de la solución binaria diluida, (figura 2), el hielo puro se separa de la solución residual (fluido intersticial) y este último se vuelve más concentrado con respecto al soluto, hasta que se forma una composición en la cual el agua y el soluto solidifican (E). La temperatura a la cual ocurre esta solidificación conjunta se le llama "temperatura eutéctica" (T_E) y a la composición, "composición eutéctica" -esto solo ocurre durante la congelación eutéctica-. Así, esta etapa (curva O, M, N, E) tiene como principal función, la separación del disolvente de los solutos. La temperatura necesaria para completar la congelación dependerá de la naturaleza del disolvente y de los constituyentes que comprendan la formulación. (Pikal, 1984; Jennings, 1999)

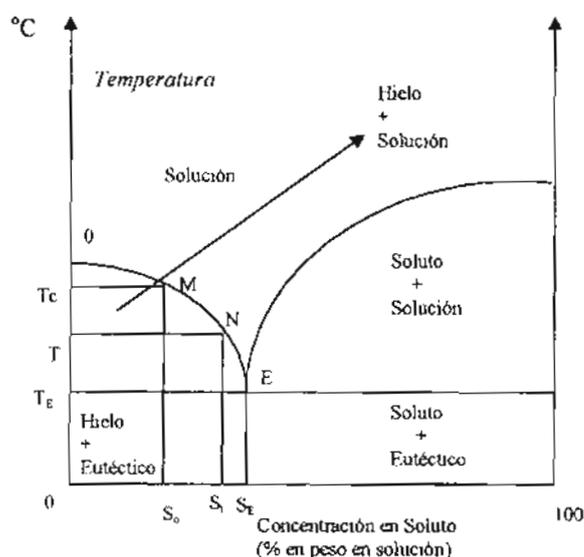


Fig. 2 Diagrama de equilibrio de una solución acuosa que origina una congelación de tipo eutéctico; donde S_o , S_i , S_e , representan la concentración crítica de la solución acuosa, la concentración intersticial de congelamiento y la concentración eutéctica, respectivamente.

Sin embargo, en muchas soluciones, como por ejemplo las soluciones de azúcares o de polímeros, el eutéctico no se forma, al menos en las condiciones habituales de congelación. En la *figura 3*, se presenta el diagrama de fases de una solución acuosa que no da lugar a la formación de un eutéctico. Así, cuando la temperatura desciende por debajo de T_E -temperatura a la que podría esperarse la formación del eutéctico- no se produce la cristalización del soluto y la congelación del agua en hielo puro continúa mientras la solución intersticial se concentra según la curva EF . En este esquema, la curva EF' representa la desviación de la concentración intersticial de congelamiento.

La separación del agua como hielo cesa a cierta temperatura (T_F), en la que la solución intersticial ha alcanzado su concentración máxima. Si el enfriamiento continúa, la solución intersticial solidifica al estado amorfo.

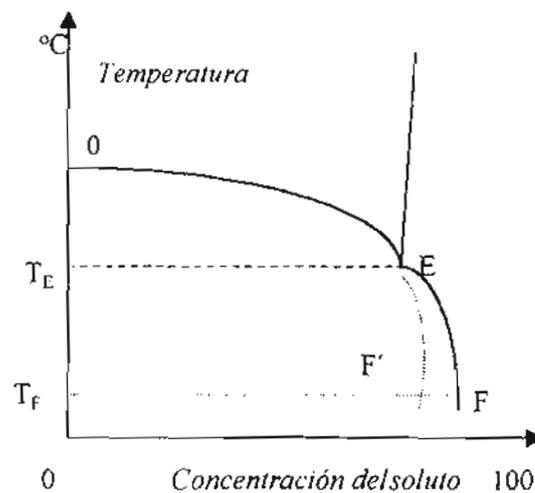


Fig. 3 Diagrama de fases de una solución acuosa para la que no se forma el eutéctico.

De manera semejante a la curva $OMNE$ de la *figura 2*, la curva OEF de la *figura 3* representa la concentración del líquido intersticial en el sistema en equilibrio a la temperatura considerada, pero en la *figura 3* el agua que no ha congelado a la temperatura de fusión (T_F), es el agua no congelable. La concentración inicial del sistema afecta la proporción que se forma de las fases: hielo y solución intersticial, pero no la concentración de esta última.

Por otra parte, ocurre con frecuencia que la concentración del líquido intersticial no puede ser descrita por la curva OEF de la *figura 3*, sino por una curva OEF' . Así, para que los cristales de hielo puedan crecer, es necesario que las moléculas del soluto se alejen de la interfase de cristalización, curva OEF , en caso contrario, la acumulación del soluto aumenta el gradiente de concentración en la solución intersticial, lo que impide la formación del hielo. El crecimiento de los cristales de hielo es inhibido por esta "polarización" de la interfase, conforme a la expresión:

$$\frac{D \cdot t}{L^2} = 1$$

Donde:

D : Es la difusividad del soluto a la temperatura definida

t : Es el tiempo en el cual el sistema permanece a esta temperatura

L : Es el diámetro de las "venas" o poros intersticiales

Por lo tanto, si el enfriamiento es muy rápido con relación a las posibilidades de difusión del soluto, las soluciones intersticiales conservan una concentración menor que la concentración en el equilibrio. A baja temperatura el agua congelable solidifica en forma amorfa. Sin embargo, si el producto sufre un recalentamiento, el agua "amorfa" se separa como hielo y la solución intersticial vuelve a tomar la concentración de equilibrio al final de la etapa de congelación.

Así también, cuando una solución se congela, el crecimiento de los cristales depende de dos mecanismos, la posibilidad de migración de las moléculas de agua para existir como cristales y, el transporte de la energía de cristalización hacia el medio de congelamiento. En este sentido existe un fenómeno denominado *subenfriamiento*, definiéndose como la disminución de la temperatura a la cual los cristales de hielo crecerán sustancialmente (nucleación); este dependerá de la sustancia a ser enfriada.

a) Grado de superenfriamiento

Se puede definir como el incremento de la temperatura a la cual ocurre la nucleación de cristales de hielo. En el diagrama de fases del agua mostrado en la *figura 4*, el punto triple B es la temperatura a la cual coexisten las tres fases (gas, líquido y sólido) y se presenta a 0°C y 4.58 Torr. La línea denotada $B-F$, representa la línea de equilibrio sólido-vapor y el segmento $F-B$ es la presión de vapor del agua líquida a temperaturas menores de 0°C . Cuando ocurre la nucleación, se forman puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y la temperatura del sistema agua-hielo se incrementa.

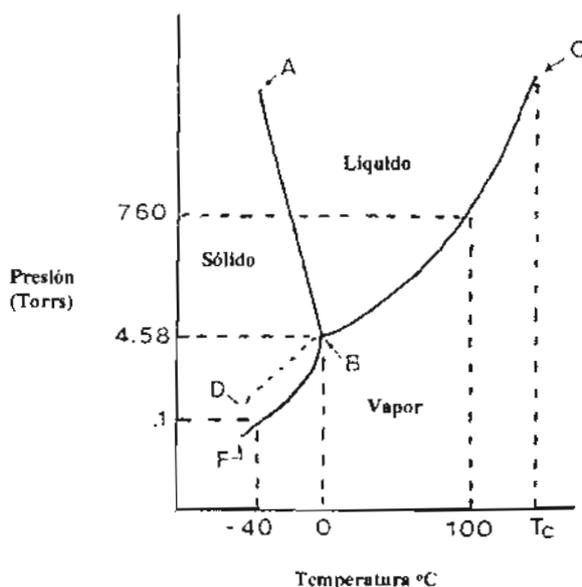


Fig. 4 Diagrama de fases para el agua.

b) Nucleación

Cuando un líquido está inicialmente a la temperatura T_A (figura 5) y se enfría bajo la presión P_A , debería cristalizar cuando su temperatura alcanza un valor más o menos bajo (T_N), según las condiciones experimentales. Entre T_M y T_N el líquido está en un estado metaestable denominado subenfriamiento. Este estado de subenfriamiento desaparece cuando inicia la aparición de cristales (nucleación). Si estos cristales pequeñitos están formados por agregados de moléculas que han aparecido espontáneamente en el líquido, se habla de nucleación homogénea; si por el contrario se han formado en el contacto de superficies o de partículas en suspensión, la nucleación se describe como heterogénea.

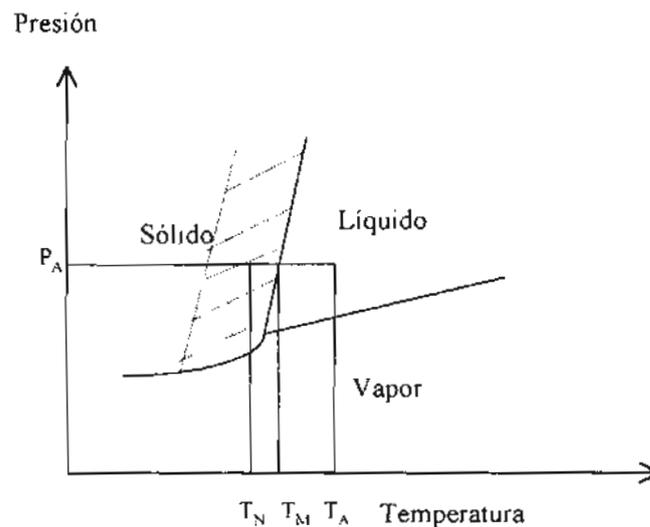


Fig. 5 Diagrama de fases de un cuerpo puro; campo rayado: zona de subenfriamiento del líquido.

1.1 Nucleación homogénea

La nucleación homogénea se define como el desarrollo de un tamaño crítico nuclear, (r^*) a través de la agregación de las moléculas.

Mediante diversas consideraciones teóricas se llega a la relación:

$$I = \frac{NkT}{h} e^{\left(-\frac{\Delta G_n + G_d}{kT}\right)}$$

donde:

I : Es el número de cristales formados por cm^3 y por segundo.
(velocidad de nucleación).

N : Es el número de moléculas por cm^3 de líquido.

T : Es la temperatura en grados Kelvin.

h : Es la constante de Planck.

K : Es la constante de Boltzmann.

G_d : Es la energía de activación para el paso de una molécula del estado líquido al sólido
(energía de activación por difusión).

ΔG_n . Es la energía necesaria para la formación de un cristal de radio igual al radio crítico (r^*), es decir, la energía necesaria para vencer las fuerzas de superficie que se oponen al crecimiento del agregado de moléculas.

Por lo anterior, ΔG_n es proporcional a:

$$\frac{\gamma^3}{(\Delta T)^2} \quad \gamma: \text{ Tensión interfacial sólido-líquido}$$

ΔT : Temperatura de subenfriamiento

Cuando la temperatura es poco inferior a la de fusión del cuerpo ΔG_n es muy grande en relación a G_d (dado que ΔT es muy pequeño) y por lo tanto ΔG_n controlará la nucleación. En consecuencia, a medida que la temperatura desciende (T disminuye y ΔT aumenta) la velocidad de nucleación I aumenta.

Por el contrario, cuando la temperatura es inferior a T_M , ΔG_n resulta despreciable en relación a G_d . Esta última aumenta (muy poco) cuando la temperatura desciende. Si T disminuye, la velocidad de nucleación también disminuye. Por lo tanto, la velocidad de nucleación debe presentar un punto máximo a cierta temperatura y sus variaciones en función del subenfriamiento serán representadas por una curva. La disminución de ΔG_n con el descenso de la temperatura, puede interpretarse como un incremento de la probabilidad de formación de los cristales. Por otra parte, el aumento de la viscosidad del líquido frena la incorporación de las moléculas a los cristales ya formados, por lo que tiende a disminuir la velocidad de nucleación con la temperatura.

1.2 Nucleación heterogénea

En la nucleación heterogénea de agua ocurre cristalización de hielo originado por un promotor externo. Tales promotores pueden ser las áreas del contenedor, las partículas de materiales presentes en el agua, o inclusive moléculas largas presentes en el medio como las proteínas. Este mecanismo no está totalmente comprendido, pero se ha propuesto que las películas de agua son adsorbidas sobre la superficie de la partícula (promotor). Debido a que la temperatura del agua está por debajo del punto triple, esas películas tienen estructuras con agrupaciones parecidas al hielo y mediante algún mecanismo se detiene la formación de la estructura del hielo pero sirven como núcleo para la formación de cristales de hielo.

La experiencia muestra que la cristalización del agua comienza a temperaturas un poco inferiores al punto de congelación teórico, ya que en este punto la probabilidad de nucleación homogénea es muy baja y la mayor parte de las veces la cristalización es inducida por partículas o superficies extrañas (nucleación heterogénea).

La importancia de la nucleación heterogénea depende del grado de división del líquido. En efecto, cuanto menor sea el volumen del líquido, menor será la probabilidad de que contenga una partícula que pueda funcionar como semilla. Por ejemplo, el agua bidestilada contiene aún muchas de estas partículas y mientras que una muestra de 100 mL puede permanecer en subenfriamiento (sin cristalizar) hasta aproximadamente -5°C , gotas

de 1 mm de diámetro pueden permanecer subenfriadas hasta -24°C y gotas de 0.1 mm hasta -30°C ; con gotas de 1 a 10 μm el subenfriamiento puede alcanzar -40°C (con agua destilada y con agua tratada con una resina intercambiadora de iones, donde el número de partículas también es relativamente bajo).

1. Crecimiento de los Cristales de Hielo

La velocidad de crecimiento de cristales de hielo bajo condiciones superenfriadas del sistema o de subenfriamiento del líquido, dependerá de la magnitud en el grado de subenfriamiento.

Este crecimiento es controlado por dos procesos físicos distintos:

- ✓ La incorporación de las moléculas en la red cristalina.
- ✓ La difusión de las moléculas desde el seno del líquido hacia la superficie del cristal (transferencia de masa), correlativa a la difusión de calor desde el cristal hacia el líquido (transferencia de calor).

La superposición de estos dos procesos conduce a la variación de la velocidad de crecimiento en función del superenfriamiento del sistema.

a) Influencia de las sustancias disueltas

En general, cuando el agua contiene solutos disueltos, el crecimiento de los cristales de hielo es inferior al que se mide en el agua pura para un mismo subenfriamiento. Si bien las sales minerales bajan considerablemente la velocidad de cristalización del agua, ciertas sustancias como el glicerol o las proteínas tienen un efecto aún más notable. Por regla general, la cristalización es más lenta conforme aumenta la concentración de las soluciones.

La presencia de sustancias disueltas favorece el subenfriamiento (o descenso crioscópico de la solución) del disolvente, así como ejemplo, existe una diferencia máxima de 2°C entre el agua pura y la que contiene una concentración 1M de halogenuros alcalinos.

b) Soluciones complejas

Una solución que contiene varias sales minerales puede congelar con varios eutécticos sucesivos, además, si una solución de sal mineral contiene otra sustancia, que en general no cristaliza en el curso del enfriamiento, el eutéctico no se formará si la proporción sal mineral y el otro soluto es inferior a determinado valor.

c) Descongelación

El calentamiento provoca una secuencia inversa. En un sistema acuoso de composición eutéctica, un proceso de fusión comienza a la temperatura eutéctica (T_E) y éste se mantiene constante como en los cuerpos puros, el tiempo que dure la fusión de ésta fase, para seguir después por la fusión del hielo a medida que la temperatura se eleva, siguiendo un sentido inverso al de la curva *OMNE* de la *figura 2*.

En un sistema no eutéctico, la fusión del hielo y la dilución de las soluciones

intersticiales comienza cuando la temperatura es superior a T_F o temperatura de fusión incipiente (figura 3).

2. Textura del Producto Congelado

El acomodo del hielo como un número más o menos grande de cristales, desempeña un papel importante en el comportamiento del producto durante la desecación y en las características del producto final. Esta distribución depende de las condiciones en las que se ha producido:

- ✓ La nucleación o aparición de cristales incipientes.
- ✓ El crecimiento de estos cristales

a) Textura resultante

La distribución del hielo, ya sea en un pequeño número de cristales grandes, o en muchos más pequeños en una muestra congelada, depende, por un lado, de la manera como se ha realizado el descenso de temperatura y por otro, de la naturaleza y concentración de las sustancias disueltas o en suspensión.

Considerando el primer caso del agua pura, a temperaturas cercanas a 0°C , la velocidad de crecimiento cristalino aumenta rápidamente, en tanto que la de nucleación permanece lenta. Por consiguiente, si una muestra de agua se conserva a este nivel de temperaturas, las pocas formaciones o núcleos iniciales podrán adquirir un desarrollo importante antes que se originen otros nuevos. La muestra congelada presentará entonces un número pequeño de cristales de gran tamaño. Suponiendo ahora, por el contrario, que la muestra se conserva líquida a una temperatura próxima a -40°C y entonces es cristalizada, incluirá un gran número de cristales muy pequeños. A esta temperatura la velocidad de crecimiento no es más elevada que en el caso anterior, pero la nucleación es mucho mayor.

Si el agua contiene además sustancias disueltas, se pueden obtener formas más finas por enfriamiento a las mismas temperaturas que en los casos anteriores. La presencia de sustancias disueltas reduce mucho la velocidad de crecimiento de cristales de las formas iniciales, por el contrario, la velocidad de nucleación se afecta en menor grado.

b) Solidificación al estado amorfo

A temperaturas inferiores a -150°C aproximadamente, la velocidad de nucleación es prácticamente nula. Por consiguiente, se logra enfriar el agua lo bastante rápido como para evitar la aparición de formas cristalinas y se obtiene un sólido amorfo (vidrio).

Aunque de apariencia rígida, un vidrio puede poseer propiedades físicas -por ejemplo, mecánicas- muy diferentes de las de un cuerpo en estado cristalino, así, las moléculas se encuentran en estado poco organizado, característico de los líquidos, por lo que se considera como un líquido extremadamente viscoso o sobreenfriado.

A priori, el fenómeno de vitrificación se debe producir más fácilmente conforme bajen las velocidades de nucleación de las sustancias consideradas, de ese modo muchos

compuestos orgánicos pueden ser obtenidos fácilmente al estado vítreo, esto también pasa con las mezclas que contienen silicatos polimerizados, mezclas que constituyen el vidrio ordinario.

En el agua pura -sustancia que alcanza velocidades de nucleación elevadas-, por el contrario, parece que la obtención del estado vítreo es imposible, al menos por enfriamiento del líquido puro (ningún investigador parece haber tenido éxito en este punto). La explicación de este fenómeno es probable que se debe a que las velocidades de nucleación sean tales, que un enfriamiento tan rápido como sea posible experimentalmente, no puede evitar las formas iniciales o núcleos, en el paso a temperaturas intermedias. Sin embargo, el agua al estado vítreo se puede obtener por condensación lenta de vapor en una superficie muy fría. En estas condiciones se forma un depósito prácticamente individual de moléculas de baja temperatura en las cuales puede ocurrir un acomodamiento.

Si el vidrio es calentado progresivamente, esta velocidad aumenta y aparecen formas iniciales cristalinas.

De acuerdo con diferentes observaciones, la velocidad de desvitrificación es importante a temperaturas próximas a -130°C . Si una muestra de hielo de textura fina (resultado de una desvitrificación o de una congelación rápida), se calienta a temperaturas superiores, es fácil observar que el tamaño de los cristales de hielo aumenta rápidamente. Este fenómeno, denominado recristalización por migración, corresponde al crecimiento de los "granos" que se observan en la industria metalúrgica y química donde se admite que este crecimiento se debe al hecho de que la presión de vapor de los cristales varía en razón inversa de su tamaño, por lo que los más grandes crecen a expensas de los pequeños.

A diferencia del agua pura, el agua de ciertas soluciones puede solidificarse fácilmente al estado vítreo. La vitrificación es importante en soluciones de glicerol o polivinilpirrolidona, pero también se obtiene con soluciones de diversas sustancias: azúcares de bajo peso molecular, aminoácidos, entre otros.

La proporción de agua solidificada al estado amorfo, depende por un lado, de la naturaleza y concentración de los solutos y por otro, de la velocidad de enfriamiento. Como se ha visto, el agua congelada que tarde o temprano ha resultado vitrificada en el enfriamiento, cristaliza con un recalentamiento.

Se puede indagar la solidificación de una muestra biológica con vitrificación del agua, si es una muestra en la que se observa la ultraestructura o conserva su actividad vital. La deshidratación sin desvitrificación es por lo común delicada y sólo tendrá éxito en condiciones particulares. Sin embargo, en la mayor parte de casos, la presencia de una fase amorfa no es favorable a la realización de la liofilización porque hace más lento el proceso de sublimación. Deberá evitarse en lo posible, el trabajo con sustancias o bajo condiciones que favorecen la vitrificación del agua.

Puesto que la etapa de congelamiento se ve afectada, por la temperatura y la tasa de enfriamiento, es de suma importancia la determinación de la temperatura eutéctica (la cual usualmente comprende un rango más que un punto único), y la temperatura de colapso

(para un sólido amorfo)(temperatura de colapso es aquella a la cual la matriz se reduce) de la solución. Esto puede conseguirse previamente, mediante la aplicación de la calorimetría diferencial de barrido; debido a que con esta técnica es posible determinar la existencia de polimorfismo y/o pseudopolimorfismo, fenómenos que condicionan la claridad (opalinidad) o la solubilidad, la velocidad de disolución, estabilidad y en consecuencia, pueden afectar la biodisponibilidad del producto liofilizado. (Fernández 1988, Pikal, 1984, Nail, 1984)

La determinación de cambios en la morfología y estado de agregación molecular de los sólidos -amorfos, cristalinos, solvatos, soluciones y dispersiones sólidas- no es sencilla, por lo que es necesario recurrir a distintas técnicas analíticas instrumentales como la microscopía óptica y electrónica, espectroscopia infrarroja, difracción de rayos X y análisis térmicos como la termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido. (Pikal, 1984, Saez, 2000)

Con respecto a la tasa de enfriamiento, ésta tiene influencia en la morfología y tamaño de los cristales obtenidos, de modo que una congelación lenta facilita la formación de cristales grandes, con superficie pequeña, y enfriamientos rápidos provocan la formación de cristales pequeños con una mayor área superficial o área expuesta a la liofilización; frecuentemente congelamientos lentos generan áreas de concentrados congelados, las cuales son difíciles de liofilizar. (Rey, 1999; Zimmermann, 2000)

Así mismo, la tasa de enfriamiento afecta la estructura interna de los sólidos, de modo que cuando el material se obtiene en estado amorfo (estructura que no es deseable porque ofrece mala reconstitución por ser demasiado higroscópica), será necesario realizar un tratamiento térmico de la solución durante el proceso de congelamiento, lo que implica un congelamiento y un calentamiento gradual, para permitir a las formas metaestables cristalizar, y posteriormente, un enfriamiento a menor temperatura que la inicial. (Zimmerman, 2000, Fernández, 1998)

Durante la etapa de congelación, todos los fluidos presentes se transforman en cuerpos sólidos, cristalinos, amorfos o vidrios, y frecuentemente, el agua tiende a generar una red de complejos de hielo, pero también puede quedar embebida en una estructura vítrea o quedar como remanente más o menos fina en el borde de los extremos intersticiales. Los sólidos se concentran y pueden ser expulsados en forma de finos cristales; al mismo tiempo la expansión volumétrica del sistema puede inducir fuerzas mecánicas de estrés que se combinan con el shock osmótico, originando incrementos en el fluido intersticial.

Un paradigma de la liofilización es entender que no existe una correlación directa entre la estructura de un producto congelado y su temperatura, sino que realmente depende de las características de la "historia térmica" del material; de modo que el conocimiento de la temperatura de una solución no es suficiente para conocer la red estructural obtenida, porque ésta dependerá de la forma por la cual dicha temperatura fue alcanzada durante la fase de congelamiento.

Ejemplos de congelamiento donde se forman matrices de hielo-producto, se observan en la *figura 6*. En la primera imagen (*6.1a*), se encuentra lleno un frasco con la

formulación líquida y taponado con un tapón de ventana; en la imagen 6.1b la matriz del hielo-producto congelado es definida por la región B. La imagen 6.1c ilustra el proceso de secado primario y la porción intersticial es definida por C; la conclusión del secado secundario es mostrada por la imagen 6.1d, finalmente el producto terminado es cerrado como se observa en la imagen 6.1e. (Jennings, 1999)

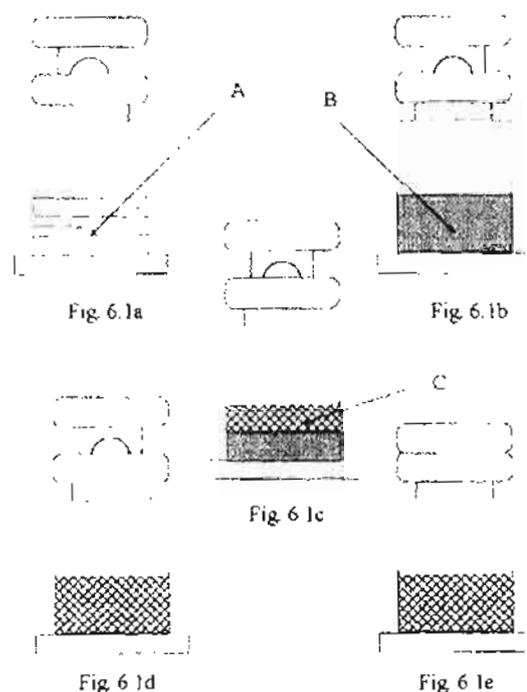


Fig. 6. Ejemplos de congelamiento donde se forman matriz de hielo-producto

Posterior al congelamiento se aplica vacío en un rango de presión de entre 5-500 μ Bar lo que ocasionará una disminución mayor de la temperatura. (Reyes, 1999)

C. SECADO PRIMARIO

En la segunda etapa de la liofilización, de secado primario, el disolvente (vapor) es extraído directamente del material congelado y, cuando se trata de masas congeladas en recipientes tales como viales o ampollitas, el secado iniciará por la parte superior del material congelado. En los lugares donde sublima el hielo, se forman pequeños orificios que no se perciben fácilmente a primera vista y a través de estos orificios, el agua en forma de vapor, sale de las capas cada vez más profundas de la masa congelada. A medida que el espesor de la masa seca aumenta gradualmente por el proceso de secado, se observa también un incremento del vapor de agua que escapa de la masa seca, y por consiguiente la tasa de sublimación disminuye durante el proceso.

Para alcanzar la temperatura de sublimación óptima, ésta debe ser lo suficientemente alta para obtener la mayor diferencia de temperatura posible, pero evitando

que ocurra la fusión de la masa congelada, consiguiéndose obtener así la máxima diferencia de presión de vapor de agua, entre el producto y el hielo condensado, a esto se le denomina “fuerza impulsora de sublimación”. (Fernández, 1998, Pikal, 1984, Jennings, 1999)

De este modo, se llevan a cabo los procesos de transferencia de masa y transferencia de calor. El calor es suministrado al recipiente que contiene la solución congelada ocurriendo un transporte de masa al condensador. Este proceso consume una gran cantidad de energía, de modo que para sublimar un kilogramo de hielo se consumen 680 Kcal. (Nail, 1980)

Al calor suministrado en esta etapa se le denomina “calor latente de sublimación” y usualmente va en aumento con el fin de mantener la velocidad de secado. Cuando la sublimación ha concluido, el producto llega a la temperatura de las placas de calentamiento; si el proceso de sublimación se detiene antes de que todo el hielo haya sublimado, cuando se interrumpe el vacío la pastilla puede sufrir un colapso.

Se designa como desorción el fenómeno de extracción del agua congelada o ligada. Así, en las condiciones prácticas, aunque el producto contiene hielo, no se mantiene a una temperatura inferior a la de fusión incipiente, por lo tanto, el producto sufre cierta fusión intersticial y la sublimación del hielo se ve acompañada por la evaporación del agua de estas soluciones

1. Influencia del Espesor del Producto

La velocidad de secado es inversamente proporcional al espesor de la capa porosa. La duración teórica de la desecación es proporcional al cuadrado del espesor del producto. Por esta razón, el espesor de los productos sometidos a liofilización será limitado: 10 a 15 mm como máximo, para productos liofilizados en frascos o en forma de placa. (Rey, 1999)

2. Transferencias de Calor

a) Transferencias internas

El aporte de calor presente en la sublimación se puede realizar por dos vías: en la capa porosa y en una congelada.

En la capa porosa: Considerando que la muestra se encuentra en forma de placa en el curso de la sublimación, y suponiendo que se calienta por su cara superior libre, las transferencias de calor por las caras laterales pueden ser despreciadas; por ello se considera que, debido a las pequeñas dimensiones de los poros de los productos liofilizados, las transferencias por *convección* son despreciables.

Por otra parte, se ha demostrado que la contribución de la *radiación* en una transferencia de calor en un medio poroso, nunca alcanza más de 10%. Por consiguiente, la transferencia de calor se realiza esencialmente por *conducción* en la red de materia seca y de los gases contenidos en los poros.

b) Influencia de la textura porosa

Cuando el diámetro de los poros disminuye, la zona de fuerte crecimiento de la conductividad se desplaza hacia las presiones bajas.

Un aumento del contenido en materia seca inicial puede incidir de dos maneras opuestas:

- ❖ Disminución del diámetro de los poros y por consiguiente, de la contribución de los gases a las transferencias térmicas.
- ❖ Aumento de la contribución de la conducción en la materia seca.

c) Transferencias externas de calor

A. *Por conducción y convección:* Para la transferencia de calor entre el elemento calefactor y la superficie del producto (superficie de la capa porosa o de la congelada), los flujos de calor transmitidos por conducción y convección se combinan en una sola expresión. En efecto, inclusive en el caso de un líquido congelado en placa y sometido a la desecación en un recipiente que reposa en la placa calefactora, las superficies no son nunca lo suficientemente lisas para que lo esencial del aporte de calor sea debido a una transferencia por contacto en la totalidad de la superficie del producto, los fenómenos de conducción gaseosa y de convección intervienen de modo significativo. Lo mismo ocurre en el caso de la liofilización en frascos. Se tiene entonces:

$$Q = H_{cc} (T_2 - T_1)$$

Donde: T_2 = temperatura de la superficie calefactora.

T_1 = temperatura de la superficie del producto (T_s o T_b).

El coeficiente de intercambio H_{cc} varía con las condiciones operatorias y en particular con los siguientes factores:

- ❖ Distancia del elemento calefactor al producto,
- ❖ Extensión del contacto elemento calefactor-producto y
- ❖ Presión y naturaleza de los gases.

De estos dos últimos factores es semejante a las transferencias de calor en la capa porosa. La zona de presión correspondiente al incremento de conductividad térmica es función de la distancia de las dos paredes entre las cuales es efectiva la conducción en el gas. A presiones muy bajas, solo intervienen las transferencias de calor por contacto o por radiación.

Por radiación: El flujo de calor transmitido por radiación desde un elemento calefactor hacia la superficie del producto es:

$$Q = \frac{F_1 S_1 \sigma}{\frac{1}{\epsilon_1} + \frac{1}{\epsilon_2} - 1} (T_2^2 - T_1^2)$$

(Considerando que el elemento calefactor y la superficie del producto son paralelas).
En esta expresión:

- F_1 : Factor de ángulo.
- S_1 : Superficie expuesta a la radiación.
- σ : Constante de Stefan.
- ϵ_2 y ϵ_1 : Poderes emisivos del elemento calefactor y de la superficie del producto, respectivamente.
- T_2 y T_1 : Temperaturas del elemento calefactor y de la superficie del producto, respectivamente.

F está cercano a uno cuando el elemento calefactor y la superficie del producto son planos paralelos de gran superficie, como es el caso de las instalaciones industriales. Por el contrario, el factor F puede volverse inferior a 1 cuando estas superficies son pequeñas, como ocurre en ciertos montajes de laboratorio.

En general, la superficie de las placas calefactoras deberán ser tratada para aumentar al máximo posible el poder emisivo ϵ_2 . Se obtienen así valores de 0.90. El poder emisivo de los productos biológicos liofilizados (ϵ_1) no es muy elevado.

El flujo de calor que se transmite al producto liofilizado por radiación será muy bajo si la temperatura de las placas calefactoras es inferior a 150 °C. (Jeannin, 1986)

3. Temperatura de la Zona Porosa

El límite superior de la temperatura que se debe respetar en esta zona, se relaciona con la necesidad de evitar dos tipos de accidentes:

1. El desmoronamiento de la estructura.
2. Las alteraciones de tipo químico y bioquímico.

Desmoronamiento de la estructura: La porosidad característica del producto liofilizado está ligada a la rigidez de la red intersticial. Esta rigidez disminuye cuando la red sufre una elevación de temperatura o un aumento de su contenido en agua. Al volverse más fluida, la red intersticial se debilita y desmorona y consecuentemente la materia se retrae.

Las consecuencias de este desmoronamiento son muy importantes porque:

- ❖ La capa de materia seca se vuelve más compacta; es difícil realizar una buena desecación.

- ❖ Los espacios capilares pueden quedar obstruidos. Como el vapor de agua no puede escapar más que por difusión en una materia seca compacta, la sublimación se hace sensiblemente más lenta. Si el aporte de calor continúa, la elevación de temperatura de la capa congelada puede provocar su fusión.
- ❖ El producto liofilizado sufre una retracción de volumen y se deforma.
- ❖ Las posibilidades de rehidratación son alteradas por el estado más compacto de la materia seca y la composición burda del producto liofilizado.

Las condiciones que determinan el desmoronamiento de la estructura han sido bien estudiadas estableciéndose que se produce en la capa porosa en la cercanía del frente de sublimación. Se estima que este fenómeno se produce en esta zona si la temperatura se vuelve superior a la de desmoronamiento (T_c), que se puede predecir a partir de la relación:

$$t = \frac{\mu\tau}{2\gamma}$$

Donde:

γ : Tensión superficial de las soluciones intersticiales.

μ : Viscosidad.

τ : Radio del capilar inicial (de los cristales de hielo).

t : Tiempo en el cual se puede producir el desmoronamiento, es decir, tiempo que separa el paso del frente de sublimación del momento en que la red está suficientemente deshidratada como para presentar un comportamiento rígido.

La disminución de la viscosidad con el aumento de la temperatura es debido a dos efectos:

- ❖ Efecto directo de la temperatura en la viscosidad.
- ❖ Dilución de las soluciones intersticiales.

Es probable que el desmoronamiento de la estructura afecte también el espesor de la capa porosa. Si se presentan los gradientes de temperatura y de contenido de agua en la capa "seca" de un producto en curso de liofilización, las circunstancias favorables al desmoronamiento de la estructura se pueden encontrar a un nivel variable de la capa seca según las condiciones de operación. La temperatura de esta capa debe ser limitada, pero una baja de presión de vapor de agua favorece la desorción y puede entonces elevar T_c .

La tendencia al desmoronamiento depende mucho de la composición química del producto. En particular, esta tendencia se reduce considerablemente con la adición de polímeros (proteínas, dextranos, pectinas, etc.).

La temperatura que provoca el desmoronamiento en la cercanía del frente de sublimación, se puede determinar por observación del producto liofilizado al microscopio. Esta técnica permite la comparación de la tendencia al desmoronamiento de diferentes soluciones.

a) Condiciones de presión

La desorción se puede realizar si existe una diferencia suficiente entre la presión de vapor del agua "ligada" y la presión parcial de vapor de agua en la atmósfera que rodea la red intersticial. La primera de ellas se deduce de las isotermas de desorción del producto.

En condiciones normales de liofilización, la red intersticial sufre la mayor parte de la desorción poco después del paso del frente de sublimación. Esto puede sorprender, *a priori*, dado que por definición, la presión de vapor del agua ligada (no congelable) es inferior a la presión de vapor del hielo a la misma temperatura, por lo que aparece como poco probable que la desorción de la capa periférica pueda originarse cuando la atraviesa el flujo de vapor proveniente de la sublimación del hielo. En general, la sublimación se conduce con un gradiente de presión de vapor elevado entre el frente de sublimación y el exterior de la muestra, lo que constituye una condición necesaria para una desecación rápida. Al mismo tiempo, la capa periférica está, con frecuencia, a una temperatura muy superior a la de la congelada, lo que favorece aún más la desorción.

D. SECADO SECUNDARIO

El secado secundario provoca la remoción de la humedad residual de la pastilla porosa; y este dependerá de la naturaleza del material, la temperatura del producto y de la presión de vapor. El secado secundario es necesario para remover agua adsorbida intermolecularmente, y este proceso generalmente implica una temperatura mas alta, la presión dentro de la cámara de liofilización generalmente es menor. Las condiciones óptimas de este proceso generalmente se obtienen a partir de las isotermas de desorción. (Pikal, 1984; Wang, 1990)

La función primaria del secado secundario es reducir el contenido de humedad residual del producto a niveles que impidan reacciones de crecimiento biológico y/o que se lleven a cabo reacciones químicas; así mismo, este proceso también ocasiona el detener el reloj cinético del constituyente activo, consiguiéndose con ello aumentar la estabilidad del producto ya liofilizado. (Jeanings, 1999)

E. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PROCESO DE LIOFILIZACIÓN

Entre las ventajas del proceso de liofilización se incluyen: el fácil procesamiento de un líquido, lo cual simplifica procesos asépticos; mayor estabilidad de polvos secos; remoción de agua sin calentamientos excesivos del producto y rápida y fácil reconstitución del producto seco.

Como desventajas de este proceso se pueden mencionar: incremento de manipulación y tiempo de proceso; necesidad de un diluyente estéril para la reconstitución y equipos costosos y complejos. (FDA, 1999)

F. ASPECTO CORRECTO DEL LIOFILIZADO

La apariencia del producto liofilizado depende en varios grados de cada uno de los pasos del proceso de liofilización; ejemplos del impacto de cada uno de esos pasos sobre la apariencia cosmética del taquete se ilustra en la *figura 7*. En ella la *figura 7.1a* representa una apariencia uniforme, esta uniformidad es resultante de la estructura de hielo que se forma durante el proceso de congelamiento y representa la estructura ideal del taquete (pasilla) de un liofilizado, donde este tiene una forma esponjosa y el volumen de la misma es equivalente al volumen de la matriz congelada (mostrada con anterioridad), en la *figura 7.1b* se forma una estructura heterogénea y es dependiente del proceso de congelación. El impacto que el proceso de secado primario puede tener sobre la estructura del taquete se observa en la *figura 7.1c*; a este fenómeno se le denomina colapsamiento del taquete, la presencia de este fenómeno ocurre cuando la matriz del hielo-producto no esta completamente en estado de congelamiento y entra a secado primario. En la *figura 7.1d* se observa un caso de extremo de colapsamiento o fusión inversa, y es resultado de la presencia de estados líquidos en la matriz de hielo-producto.

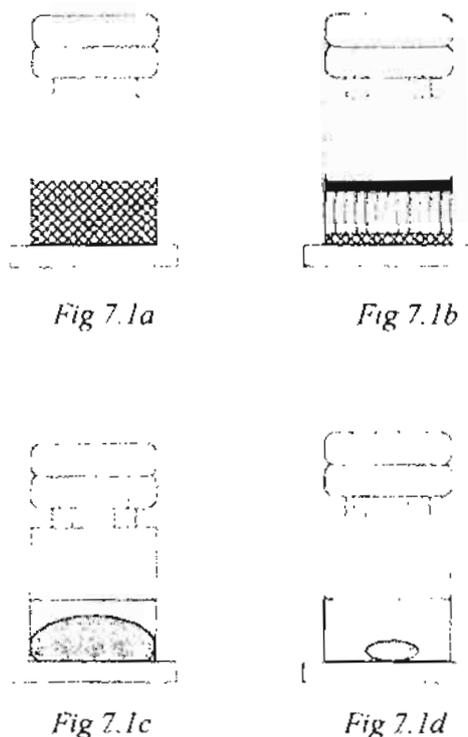


Fig. 7. Ejemplos de apariencias de liofilizados (7.1a; uniforme, 7.1b; heterogénea, 7.1c; colapsada y 7.1d; fundida).

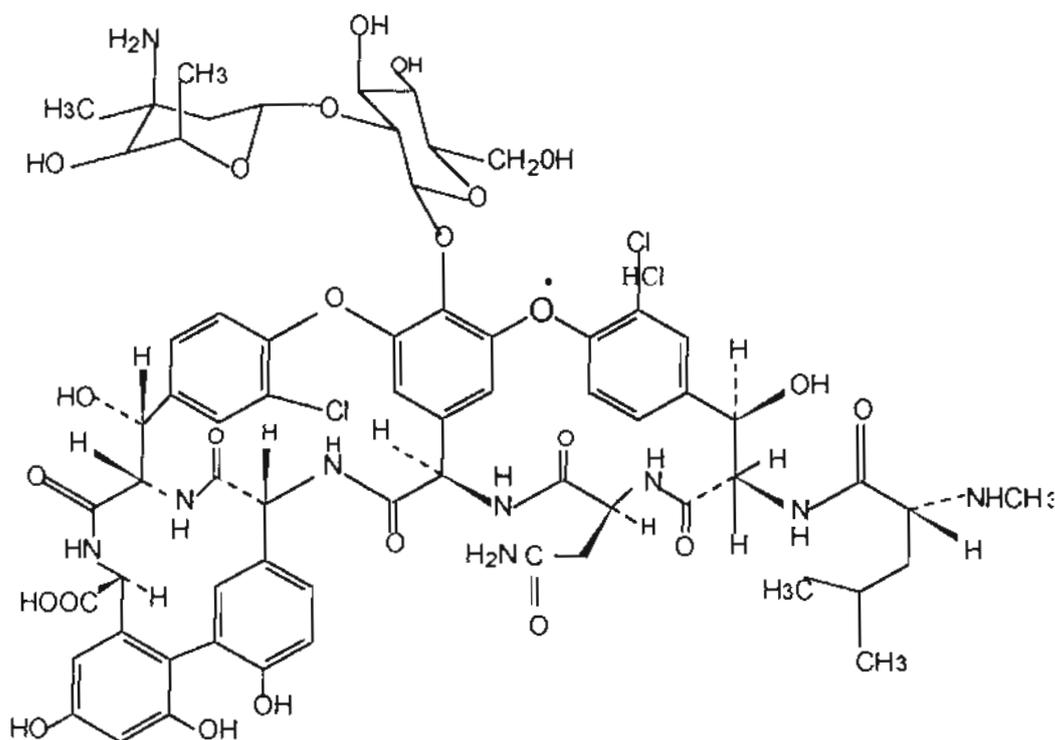
G. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LA VANCOMICINA

I. Vancomicina clorhidrato, Materia Prima

La vancomicina es un glucopeptido complejo; presenta actividad como antibiótico y es producido por el *Streptomyces orientalis*, un actinomiceto aislado de muestras de suelo obtenidas en Indonesia e India. (Micromedix)

El clorhidrato de vancomicina es la forma comercial de este principio activo y a continuación se proporcionan algunos datos relevantes relacionados con su estructura química y propiedades fisicoquímicas y farmacológicas.

- a) Aspecto: Polvo cristalino de color blanco a amarillo, con olor característico
- b) Fórmula molecular: $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24} HCl$ (Merck Index)
- c) Peso molecular: 1485.71 g/mol (Merck Index)
- d) Fórmula desarrollada:



(Merck Index)

- d) Nombre químico: (Sa)-(3S,6R,7R,22R,23S,26S,36R,38aR)-44-[[2-O-(3-amino-2,3,6-trietoxi-3-C-metil- α -L-lyxo-hexopiranosil)- β -D-glucopiranosil]oxy]-3-(carbamoilmetil)-10,19-dicloro-2,3,4,5,6,7,23,24,25,26,36,37,38,38a-tetradecahidro-7,22,28,30,32-pentahidroxi-6-[(2R)-4-metil-2-(metilamino) valeramino] -2,5,24,38,39 - pentaoxo - 22 H-8,11:18,21-dieteno-23,36-(iminometano)-13,16:31,35-dimeteno-1H,16H-1,6,9]oxadiazaciclohexadecinol[4,5,-m][10,2,16]-benzoxadiazacicotetracosina-26-ácido carboxílico, clorhidrato. (Merck Index)
- e) Conservación: Conservar en contenedores bien cerrados, no exponer a luz ni a calor. (Micromedix)
- f) Solubilidad: Librementemente soluble en agua. (Micromedix)
- g) Punto de fusión: Descompone con calor, no reportado. (Micromedix)

2. Producto Terminado.

a) Descripción:

Los productos liofilizados comerciales de vancomicina clorhidrato, contienen un polvo blanco a casi blanco, higroscópico. (FEUM; Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos)

b) Propiedades farmacológicas

1.1 Absorción, distribución y excreción

La vancomicina se absorbe poco después de la administración oral, y se excretan grandes cantidades por heces. Una sola dosis intravenosa de 500 mg en adultos produce, al cabo de 1 o 2 horas, concentraciones plasmáticas de 6 a 10 $\mu\text{g/mL}$, de 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$ después de 6 horas y de 1 a 2 $\mu\text{g/mL}$ después de 12 horas. Aproximadamente 10 % de la Vancomicina se liga a proteínas plasmáticas.

1.2 Vías de administración y dosis

El clorhidrato de vancomicina estéril se vende para uso intravenoso como polvo para solución. La dosis deseada se diluye e inyecta preferentemente durante 30 a 60 minutos cada 6 o 12 horas. La dosis para adultos es de 500 mg cada 6 ó 12 horas, o 1 gramo cada 12 horas, ésta alcanza una concentración estable de 15 $\mu\text{g/mL}$. La dosis diaria para niños es 44 mg/Kg en cantidades igualmente divididas y espaciadas cada 6 o 12 horas.

1.3 Usos terapéuticos

Debe emplearse únicamente para tratar infecciones serias y es particularmente útil en el tratamiento de infecciones debidas a *Estafilocococs meticilinarresistentes*. También es extremadamente útil en infecciones estafilocócicas severas de pacientes alérgicos a penicilinas y cefalosporinas. (Goodman, 1986)

H. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS AL ANÁLISIS CRISTALOGRÁFICO DE LA MATERIA PRIMA Y LIOFILIZADO.

I. Microscopía Óptica

a) Generalidades

La microscopía óptica junto con la microscopía electrónica de barrido, permite obtener información sobre la naturaleza física de las superficies sólidas. El microscopio compuesto combina dos sistemas de lentes convergentes: el objetivo y el ocular, dispuestos en posiciones fijas en los extremos opuestos de un tubo cuya longitud puede ser modificada, con ello se consigue obtener una imagen real aumentada del objeto de observación, que a su vez se observa a través del ocular como una imagen virtual aún más aumentada.

Uno de los microscopios de gran utilidad en farmacia para el análisis cristalográfico, es el microscopio polarizante, ya que permite, mediante una simple observación, definir si un material en polvo corresponde a un sólido amorfo o cristalino .

Mediante ésta técnica es posible observar el hábito cristalino y determinar el tamaño de las partículas, Así la USP 25 ha establecido como método general de análisis el de Microscopía, que se fundamenta en la observación, primero de la luz polarizada que se hace incidir sobre el sólido para determinar si este es cristalino o amorfo y posteriormente en la descripción del hábito.

b) Descripción

El microscopio compuesto combina dos sistemas de lentes convergentes: el objetivo y el ocular, dispuestos en posiciones fijas en los extremos opuestos de un tubo cuya longitud puede ser modificada, con ello se consigue obtener una imagen real aumentada del objeto de observación, que a su vez se observa a través del ocular como una imagen virtual aun más aumentada.

El objeto a observar se sitúa por lo general en una placa de vidrio que es colocada sobre la platina del microscopio. En esta posición, desde abajo recibe regularmente un haz de luz natural o de una lámpara. Una parte importante para una adecuada observación de la muestra en un microscopio, son los objetivos, los cuales pueden cambiarse y, para un trabajo normal, es suficiente disponer de tres objetivos acromáticos: bajo (3,2X ó 4X), medio (10X ó 20X), o alto (40X ó 45X).

Uno de los microscopios de gran utilidad en el análisis cristalográfico de las materias primas farmacéuticas, es el microscopio polarizante, ya que permite, mediante una simple observación, definir si un material pulvulento corresponde a un material cristalino o amorfo. El microscopio polarizante es algo más que un microscopio compuesto al que se le han incorporado dos polarizadores, sin embargo, para simplificar de alguna manera su descripción, se puede indicar que además de las partes comunes que corresponden a un microscopio compuesto, contiene un elemento polarizador bajo la platina, denominado

nicol inferior o polarizador, y un segundo polarizador colocado por encima de la platina, denominado nicol superior o analizador.

2. *Microscopia Electrónica de Barrido.*

a) Generalidades

Durante el transcurso del siglo XX se desarrolló una amplia variedad de métodos para la caracterización de superficies, y de esta manera surgieron los *métodos clásicos*, que hasta la actualidad son de gran importancia para obtener información sobre la naturaleza física de las superficies, puesto que implican la obtención de imágenes mediante microscopía óptica y electrónica, al igual que la obtención de isothermas de adsorción, la determinación de área y rugosidad superficial y tamaño de los poros.

Por otra parte, a comienzos de los años cincuenta, en respuesta a las necesidades de ciertas áreas de la ingeniería y otras ciencias, donde el conocimiento de la composición química de la capa superficial de un sólido puede ser mucho más importante que la composición general del material, se introdujeron los métodos espectroscópicos para obtener información acerca de la naturaleza química de las superficies de los sólidos, determinándose las especies químicas que las recubren, así como su concentración.

Hasta la fecha, existen aproximadamente una docena de técnicas espectroscópicas de superficie, entre las que más ampliamente se han utilizado se cuentan: la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X o espectroscopía de electrones para análisis químico, la espectroscopía de electrones Auger, la espectroscopía fotoelectrónica ultravioleta, la espectrometría de masas de ion secundario, la espectrometría de masas con microsonda de láser y la microsonda electrónica. (Valls, 1998)

Para los efectos del presente estudio, únicamente se emplearon las técnicas de obtención de imágenes de superficie de los sólidos por microscopía.

b) Importancia

Como ya antes se ha señalado, el conocimiento a detalle de la naturaleza física de la superficie de los sólidos en muchos campos de la química, la geología, la biología, las ciencias de los materiales y la farmacia, ha ido cobrando cada vez mayor importancia, sin embargo, hasta hace pocos años estuvo supeditado a la resolución que ofrecía la microscopía óptica, que a su vez está limitada por los efectos de difracción de la longitud de onda de orden similar a la de la luz.

Para aumentar el poder de resolución de los microscopios a lo obtenido con los microscopios ópticos ordinarios, se requiere utilizar un instrumento que use radiaciones de longitud de onda mucho más cortas -haz de electrones- que las de la luz visible, así como lentes eléctricas o magnéticas en sustitución de las lentes ópticas.

De tal forma, surgieron los microscopios de mayor resolución, que se fundamentan en su operación, en la teoría de la dualidad onda-corpúsculo de De Broglie, al emplear

ACVA
CORPORATIVO
SERVICIOS DE
INFORMACIÓN

chorros de electrones acelerados mediante diferencias de potencial del orden de 40 a 60 KV, que dan lugar a partículas -electrones- a los que se puede asignar un movimiento ondulatorio con una longitud de onda asociada con valores del orden de picómetros y con propiedades características, tales como difracción e interferencia. (Valls, 1998; Dyer, 1973)

El haz de electrones de alta energía dirigido sobre una muestra, puede dar lugar a tres distintos tipos de interacción:

1. El electrón incidente no choca con ningún átomo de la muestra y se transmite sin dispersión.
2. El electrón colisiona e interacciona con el núcleo atómico y debido a la diferencia considerable de sus masas, el electrón es dispersado sin que se produzca intercambio de energía. De este modo, la dispersión es de tipo elástico y el ángulo de dispersión puede ser pequeño, en cuyo caso el electrón se transmite, o bien muy grande, originándose reflexión.
3. El electrón incidente choca con un electrón de la muestra y al poseer la misma masa, tienden a intercambiar su energía y la dispersión que se origina es de tipo inelástico. De tal forma, el electrón incidente pierde velocidad y aumenta su longitud de onda, además, el ángulo de dispersión es menor que en el caso de la interacción electrón-núcleo atómico y por ello todos los electrones son transmitidos.

Cuando ocurre la dispersión inelástica, tienen lugar otros fenómenos como la emisión de rayos X y de electrones secundarios procedentes de la preparación, así como algo de radiación visible.

Debido a que los electrones dispersados inelásticamente pierden velocidad, para que la probabilidad de dispersión sea mayor, el grosor de la preparación de la muestra tendrá que ser relativamente grande, además, como la dispersión es directamente proporcional al número atómico -porque el número de electrones es mayor-, ambos parámetros de la preparación de la muestra, grosor y número atómico, influirán en la calidad de los resultados observados.

No obstante lo anterior, se tiene que establecer un compromiso entre el grosor de la preparación y la resolución o calidad de la imagen a conseguir, puesto que la imagen electrónica de un objeto representa la distribución de su densidad y aquellos lugares en que ésta sea mayor, serán donde se perderán más electrones por difusión. Así mismo, estos haces de electrones transmitidos -que poseen velocidades poco homogéneas-, darán lugar a imágenes borrosas.

Así pues, el grosor de las muestras será variable, de modo que para una resolución de 10 nm, el espesor debe ser como máximo de 0,1 μm y de 5 a 10 nm de espesor si se quiere conseguir resoluciones de 1 nm.

Por otra parte, un aspecto importante a considerar en relación con el grosor de la muestra, es que algunos electrones incidentes son absorbidos por ésta, ocurriendo una transferencia de energía que se traduce en el calentamiento de la muestra, con lo cual para el caso de material orgánico y biológico, que son malos conductores del calor, puede producirse su sobrecalentamiento, dando lugar a vibraciones e incluso la alteración o ruptura de la muestra.

En la actualidad, los microscopios electrónicos de mayor utilización se clasifican en tres categorías:

Microscopios electrónicos de formación de imágenes estigmáticas (imágenes de Gauss), que actúan como los microscopios ópticos convencionales. La imagen está formada por lentes electrónicas y se rigen por las leyes clásicas de la óptica aplicadas a la onda asociada a los electrones. Por lo general funcionan por transmisión.

Microscopios electrónicos de barrido, donde la imagen se forma de modo secuencial por el tratamiento de las informaciones suministradas al interaccionar un haz de electrones que barre el objeto. Estos instrumentos forman la imagen por reflexión o por transmisión, pero sobre todo por emisión secundaria, de modo que la imagen puede ser formada no solo por los electrones emitidos y los secundarios, sino también por rayos X, infrarrojos, iones y hasta ondas sonoras.

Microscopios electrónicos de efecto "túnel", donde la imagen se forma por la corriente térmica que se origina entre la muestra y un punto muy fino, una sonda a escala atómica, que explora el potencial de la nube electrónica que envuelve la superficie de los sólidos y que suministra una imagen topográfica de la superficie.

c) Descripción

Este instrumento emplea una técnica de formación de imagen muy semejante a la utilizada en televisión con formación de imágenes secuenciales, que en este caso depende del fino haz de electrones, del dispositivo de barrido y de la ubicación de los detectores.

La muestra que es barrida por una sonda electrónica, es la fuente de la emisión de los electrones secundarios, emisiones de rayos X y de fotones luminosos, formación de campos eléctricos o magnéticos, que a su vez son transformados en señales eléctricas e imagen, mediante los correspondientes sistemas de detectores. Con un microscopio electrónico, el "barrido" de la muestra con el haz electrónico se efectúa tanto en la dirección del eje "X" a lo largo de la muestra, como en la dirección del eje "Y", efectuándose ésta operación con movimientos rápidos del haz, de modo que la superficie de la muestra puede ser irradiada completamente.

Para la observación de las muestras, es necesario disponer de una técnica preparativa que dependerá del tipo de muestra y entre las distintas técnicas que se han

desarrollado, se puede mencionar que para el caso de muestras orgánicas como el material pulverulento o granular, cristalino o amorfo de las materias primas o preparados farmacéuticos, se suele dispersar la muestra sobre una película adhesiva colocada en un soporte metálico y a su vez, al material así adherido, se le aplica por condensación de vapor en una cámara con vacío, una película de oro como medio conductor y de contraste.

El tipo de detector de electrones más común utilizado en los microscopios electrónicos de barrido, es el detector de centelleo -que consiste en un vidrio dopado o una placa de plástico que emite una cascada de fotones visibles cuando es alcanzado por un electrón-, o bien por detectores a base de semiconductores -láminas semiconductoras -.

3. Espectrofotometría Infrarroja

a) Generalidades

El espectro de las radiaciones infrarrojas comprende un conjunto de longitudes de onda subdividido con fines prácticos en distintas zonas -cercana, media y lejana-, cuyos límites son aproximada y respectivamente, $0.8 - 2.5 \mu\text{m}$ (12500 a 4000 cm^{-1}); $2.5 - 15 \mu\text{m}$ (4000 a 667 cm^{-1}) y $15 - 200 \mu\text{m}$ (667 a 50 cm^{-1}). Cada una de estas regiones tiene sus propias características de interacción con la materia, y el infrarrojo medio, designado habitualmente como infrarrojo, es el que mayor campo de aplicación ha tenido en análisis instrumental hasta hace algunos años.

En la mayoría de los casos, las aplicaciones que tiene la espectroscopia infrarroja (IR) en Farmacia, es de índole cualitativa, como es el caso de la comprobación de la identidad del espectro IR de las muestras con el espectro de sus respectivos patrones, aunque esto no quiere decir que no pueda emplearse para análisis cuantitativos, de hecho, la aparición durante la última década de espectrómetros con transformada de Fourier, a costos relativamente bajos, ha aumentado notablemente el número y aplicaciones de la radiación del infrarrojo medio, como lo es su utilización en los estudios microscópicos de superficies, análisis de sólidos mediante reflectancia total atenuada y otros.

Cabe señalar que la radiación en el infrarrojo no es lo suficientemente energética para producir la clase de transiciones electrónicas que se dan cuando la radiación es ultravioleta, visible y de rayos X, de modo que la absorción de radiación en el infrarrojo se limita en gran parte, a especies moleculares, para las cuales la absorción de cuantos de radiación ocasiona transiciones en estados energéticos vibracionales y rotacionales.

Para absorber radiación en el infrarrojo, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. El momento dipolar está determinado por la magnitud de la diferencia de carga y por la distancia entre los dos centros de carga de una molécula. Sólo en estas circunstancias, el campo eléctrico alterno de la radiación puede interaccionar con la molécula, y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos.

Cuando la frecuencia de la radiación coincide exactamente con la frecuencia de vibración natural de la molécula, tiene lugar la transferencia neta de energía que origina un

cambio en la amplitud de la vibración molecular, cuya consecuencia es la absorción de la radiación.

De manera análoga, la rotación de las moléculas asimétricas alrededor de sus centros de masa, puede producir una variación periódica en el dipolo que puede interactuar con la radiación.

Lo anterior explica que especies homonucleares como el O_2 , N_2 o Cl_2 , presenten momentos dipolares que no sufren un cambio neto durante la vibración o la rotación y, como consecuencia, no absorban radiación infrarroja.

Los espectros infrarrojos de los compuestos poliatómicos covalentes, generalmente son muy complejos, pues constan de numerosas bandas de absorción estrechas, contrastando con los espectros comunes del ultravioleta y visible.

En el campo de la investigación farmacéutica, la espectroscopía infrarroja tiene gran interés junto con otras técnicas espectroscópicas como método de asignación de estructuras en nuevos compuestos de síntesis orgánica, de modo que es posible relacionar las frecuencias de ciertas bandas de absorción en IR con la presencia de determinados enlaces o grupos funcionales de la molécula.

Mediante el estudio de innumerables compuestos orgánicos y siguiendo distintos métodos de comprobación, con el tiempo ha sido posible asignar a los principales compuestos y aún la forma de estas bandas, pueden variar de acuerdo con las condiciones estructurales y electrónicas, y también por cambios en el estado físico o en el disolvente utilizado para preparar la muestra.

De tal forma, que se han establecido los siguientes postulados fundamentalmente sobre la utilidad de la espectroscopia infrarroja:

- Las sustancias orgánicas presentan frecuencias de grupo, características en la región IR.
- El espectro de absorción de una sustancia dada, es específico para dicha sustancia, es decir, es posible que dos o más sustancias que tengan los mismos grupos funcionales, presenten espectros muy parecidos, pero en su conjunto deben existir varias diferencias que permiten individualizar cada espectro.
- El espectro de absorción de mezclas de sustancias, generalmente es aditivo, es decir, correspondiente a la suma de los espectros individuales de los componentes.
- La intensidad de una banda de absorción está relacionada con la concentración de la sustancia que absorbe la radiación incidente.

La interpretación de los espectros IR requiere no sólo de buenos conocimientos

teóricos, sino también de mucho entrenamiento, ya que se debe ser capaz de correlacionar rápidamente posición, forma e intensidad de las bandas, y conjugarlos con los datos químicos que se posean.

De tal forma, ha sido posible establecer regiones del espectro que permiten identificar grupos funcionales como es el caso de la zona de frecuencias de grupo, que va de 4000 a 1300 cm^{-1} , que corresponde a las vibraciones producidas por sólo dos átomos de la molécula tal como C, O, N... de peso atómico menor de 19-, y que ocurren entre 4000-2500 cm^{-1} .

Las bandas propias de triple y dobles enlaces (C=O, C=C, C=N, N=O,...) se observan, respectivamente, entre 2500-2000 cm^{-1} y 2000-1500 cm^{-1} .

La frecuencia de cada banda del espectro de vibración y vibración-rotación molecular depende de la constante de fuerza de cada enlace interatómico y de ahí que los espectros de absorción en la región infrarroja dependan del conjunto de enlaces que constituyen la estructura molecular y sean distintos y característicos de cada molécula.

La región de frecuencias de radiación IR entre 1600 y 650 cm^{-1} , corresponden a las vibraciones de tensión de los enlaces simples y a las vibraciones de la estructura molecular de moléculas complejas, tales vibraciones se denominan de "esqueleto", ya que se extienden sobre el esqueleto molecular total, en lugar de estar localizadas sobre un solo grupo pequeño. Sin embargo, lo más interesante, es que el aspecto del espectro infrarrojo en la región de 1250 a 600 cm^{-1} es característico para cada molécula, hasta tal punto que se considera que no existan dos moléculas diferentes que tengan el mismo espectro en esta región, de ahí que se le denomine zona de la huella dactilar de la molécula.

La preparación de las muestras para el análisis por espectroscopía IR es distinta según se trate de una sustancia en estado sólido o líquido y del propósito del ensayo. Las muestras líquidas se colocan por lo general directamente en celdas especiales que consisten regularmente en dos ventanas de material transparente a la radiación infrarroja -CsI, NaCl, entre otras-, montadas en un separador metálico que permite variar la distancia entre ellas. Una de las caras del separador está dotada de dos tubos de llenado y vaciado de la muestra.

Las muestras sólidas se pueden estudiar en solución, en suspensión -mulls- o en pastilla. Cuando la muestra se utiliza disuelta debe tenerse presente que todos los disolventes conocidos presentan bandas de absorción en la región IR que pueden inferir con las propias de la muestra, por lo que resulta adecuado realizar una selección.

Las muestras en solución se preparan por lo general a una concentración aproximada al 1% y se utilizan cubetas similares a las de las muestras líquidas con un espesor de 0.1 mm. También suele emplearse con cierta amplitud, cloroformo, el cual es evaporado para dejar una fina película sobre la cubeta o bien si se deja en solución, la concentración de la muestra debe ser como mínimo del 10% para contrarrestar el efecto de las numerosas bandas de absorción de este disolvente.

Cuando la muestra se prepara en forma de suspensión en un mortero de ágata, se dispone una mezcla íntima del sólido en polvo previamente secado, con unas gotas del líquido transparente a la radiación IR -que suele ser Nujol (parafina líquida densa) o Fluorolube (perfluoruro de queroseno)-, hasta conseguir una pasta uniforme. La pasta así obtenida se coloca entre dos láminas de NaCl o de otro material adecuado.

La técnica más utilizada en Farmacia para muestras sólidas es la formación de comprimidos, que consiste en pesar una pequeña cantidad de muestra (alrededor de 1 mg), la cual deberá haber sido previamente desecada y se mezcla mediante pulverización en un mortero de ágata, con KBr seco. El contenido de la sustancia en ensayo en la mezcla debe ser de aproximadamente 3-5%.

La mezcla se comprime con la ayuda de una matriz y punzón de acero templados, en una prensa especial tras extraer el aire por vacío. La presión aplicada puede oscilar por lo regular entre 1418 y 2026 MPa (140 y 200 Kp/cm²). El comprimido resultante se coloca en un soporte para situarla posteriormente en el compartimiento de muestra del instrumento. Es recomendable termostatar.

b) Infrarrojo cercano

En la región del infrarrojo cercano (NIR, de near-infrared)(o IRC) que se toca con la región visible aproximadamente a los 12500 cm⁻¹ (0.8 micrómetros) y se extiende aproximadamente a los 4000 cm⁻¹ (2.5 micrómetros), hay muchas bandas de absorción que provienen de sobretonos armónicos de la banda fundamental o de bandas en combinación asociadas con los átomos de hidrógeno. Entre éstas se encuentran los primeros sobretonos de las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y N-H, cerca de los 7140 cm⁻¹ (1.4 micrómetros) y de los 6667 cm⁻¹ (1.5 micrómetros), respectivamente; también se encuentran bandas de combinación que resultan de las vibraciones de estiramiento y de deformación del enlace C-H de los grupos alquilo, a los 4548 cm⁻¹ (2.2 micrómetros) y a los 3850 cm⁻¹ (2.6 micrómetros).

La absorptividad de las bandas del NIR (o IRC) es de 10 a 100 veces menores que la de las bandas del infrarrojo intermedio, pero el espesor de las capas de muestra (0.5 a 10 mm) compensa este inconveniente ya que las absorptividades son tan pequeñas, que el haz de NIR penetra más profundo dentro la muestra en las técnicas de reflectancia; además, las impurezas menores dan menos problemas que en el infrarrojo intermedio, tanto en los métodos de transmisión como de reflectancia.

La región de NIR es accesible con técnica de cuarzo y esto se acopla con mayor sensibilidad a los detectores de infrarrojo cercano y fuentes de radiación más intensas. Esta región se usa para trabajo cuantitativo, además de la región cualitativa. Se usan bandas de absorción a los 2.76, 1.9 y 1.4 micrómetros, dependiendo de la concentración de la sustancia por analizar, cuando interferencias debidas a otras bandas de absorción son grandes, o cuando se están estudiando concentraciones de agua muy bajas, el agua puede extraerse con glicerol o con etilenglicol antes de la medición.

Los espectros de reflectancia en el infrarrojo cercano encuentran amplia aceptación en la industria de granos, alimentos y farmacéutica. La composición del material que va ha

ACERCA AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLOS

ser analizado debe estar restringida a un número finito de muestras conocidas. La computadora del equipo mide y registra los espectros de estas muestras conocidas a un gran número de longitudes de onda, posteriormente las computadoras desarrolla un conjunto de ecuaciones que se usan para analizar la muestra problema.

El método es fácil y rápido para análisis de rutina y para muchas sustancias, la preparación de la muestra es extremadamente sencilla; la muestra es simplemente vertida en una celda que se coloca en el portaceldas del instrumento. El método de reflectancia del infrarrojo cercano en realidad depende del patrón de reconocimiento de la computadora.

4. Difracción de Rayos X

Los rayos X fueron descubiertos por Roentgen en 1895, y son radiaciones electromagnéticas de la misma naturaleza que la luz visible, pero su longitud de onda es más pequeña y se sitúa entre 0,002 a 10 nm. La difracción de polvos utiliza longitudes de onda que abarcan las distancias interatómicas dentro de una molécula (alrededor de 0,02 a 2,5 nm).

Las técnicas de difracción de rayos X se desarrollaron más a partir de 1912, cuando Max Von Laué y sus colaboradores obtuvieron el primer diagrama de difracción de rayos X para un cristal. Este resultado confirmó la estructura ordenada y periódica de miles de cristales. Estas técnicas no destructivas han evolucionado hasta nuestros días, siendo de gran utilidad para los analistas y los cristalógrafos, para la caracterización de materiales no sólo en campos tales como la mineralogía, la metalurgia, la biología, la química estructural, la microelectrónica, la investigación policíaca, y el medio ambiente, sino también para el control de numerosos procesos industriales.

El análisis de polvos representa la aplicación más extendida: el difractograma obtenido después de la irradiación de una muestra con un haz de rayos X, constituye la carta de identidad de esa estructura cristalográfica. La medida precisa de la posición y la intensidad de todos y cada uno de los picos de difracción, permiten determinar la naturaleza y eventualmente la concentración de las diferentes fases cristalinas que constituyen la muestra. La difracción de rayos X permite asimismo, obtener información de los orígenes del cristal, tales como la textura, las fuerzas residuales, la posición de los átomos dentro de la malla cristalina, la caracterización de la formación de las capas cristalinas, etcétera.

Para los laboratorios farmacéuticos el control de calidad de materias primas y formas farmacéuticas exige la aplicación de técnicas analíticas instrumentales, complementarias a las establecidas hasta la actualidad en las farmacopeas, ya que se ha visto la necesidad de apoyar sus especificaciones con otros análisis que permitan diferenciar no sólo la pureza de un material, sino también su grado de cristalinidad, que es bien sabido afecta el desarrollo de las formulaciones, a los procesos de fabricación y a la estabilidad de los productos.

La difracción de rayos X es una técnica de elección (Broquiere, 1995) para:

- * La caracterización y el conocimiento del principio activo.
- * El seguimiento de su integridad durante su inclusión en la forma farmacéutica y durante los estudios de estabilidad y de envejecimiento.
- * La identificación rápida de los principios activos o de los excipientes.

Entre las ventajas que benefician a un laboratorio de análisis de control farmacéutico que dispone de esta técnica, se puede mencionar la realización de los siguientes ensayos:

- 1) Identificación de polimorfos provenientes de distintos sistemas de recristalización o identificación de mezclas de polimorfos en un lote de producción.
- 2) Estudios de cambios polimórficos y estabilización de polimorfos en presencia de distintos materiales.
- 3) Estudios de estabilidad de principios activos y excipientes en fase de preformulación, mediante control de humedad, presencia de oxígeno y cambios de temperatura en la cámara de la muestra.
- 4) Identificación de compuestos que presentan isomería óptica (enantiómeros y mezclas racémicas).
- 5) Identificación y eventualmente cuantificación, de componentes de una mezcla.
- 6) Identificación de cambios cristalinos que pueden presentarse con el principio activo o excipientes, durante la formación del producto sólido en operaciones tales como la granulación, la liofilización, la compresión, entre otros.

a) Ley de Bragg

De la misma forma en que ocurre con otros tipos de radiación electromagnética, la interacción entre el campo eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa, da lugar a una dispersión.

Cuando los rayos X son dispersados por el entorno ordenado de un material cristalino, tienen lugar interferencias, tanto constructivas como destructivas, entre los rayos dispersados, lo cual se debe a que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación, y el resultado es la difracción.

Y esta ecuación es la denominada *ecuación de Bragg*.

Sólo si el ángulo de incidencia de los rayos X satisface la condición:

$$\text{sen } \theta = n\lambda/2d$$

Éstos serán reflejados, de otro modo, tendrá lugar interferencias destructivas.

Los componentes de los instrumentos que se usan para la difracción de rayos X, funcionan de manera análoga a los cinco componentes de los instrumentos empleados en espectroscopía óptica, aunque difieren considerablemente en cuanto a los detalles: incluyen una fuente de radiación, un dispositivo encargado de seleccionar la longitud de onda de la radiación incidente, un soporte o compartimento para la muestra, un detector de radiación (transductor), un procesador de la señal y un dispositivo de lectura y medida.

b) El método del polvo cristalino

Este es un método analítico capaz de suministrar información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos presentes en una muestra sólida, y se basa en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único.

Para los estudios analíticos por difracción de rayos X, la muestra se fragmenta hasta obtener un polvo fino homogéneo, de forma tal que los numerosos pequeños cristales estén orientados en todas las direcciones posibles y, por tanto, cuando un haz de rayos X atraviesa el material, se puede esperar que un número significativo de partículas estarán orientadas de tal manera que cumplan la condición de Bragg de la reflexión para todos los espaciados interplanares posibles.

c) Interpretación de los diagramas de difracción

La identificación de especies mediante los diagramas de difracción de polvo cristalino, se basa en la posición de las líneas -en términos de θ o 2θ y en sus intensidades relativas. El ángulo de difracción 2θ se determina por el espaciado entre un grupo particular de planos, con la ayuda de la ecuación de Bragg, y la distancia d se calcula a partir de una longitud de onda de la fuente conocida y del ángulo medido. Las intensidades de la línea dependen del número y del tipo de centros atómicos de reflexión que existen en cada grupo de planos.

La identificación de los cristales es empírica, y el Centro Internacional para Datos de Difracción (International Centre for Diffraction Data, Swarthmore, PA), dispone de un fichero de polvo cristalino que comprende más de 50.000 compuestos.

Los ficheros de datos de difracción se han dividido en subficheros que contienen listados para compuestos inorgánicos, orgánicos, minerales, metales, aleaciones, muestras forenses y otros. Los datos que contienen son los espaciados d y las intensidades de línea relativas. Las entradas están ordenadas por orden del espaciado d de la línea más intensa, y

de este fichero se separan las entradas en las que el espaciado d difiere en pocos cientos de Angstrom del espaciado d de la línea más intensa del analito. (Valls, 1998)

La eliminación posterior de los posibles compuestos se lleva a cabo considerando el espaciado de la segunda línea más intensa, después la tercera y así sucesivamente. Normalmente, tres o cuatro espaciados sirven para identificar el compuesto sin ambigüedad, sin embargo, en la actualidad se dispone de programas de búsqueda por ordenador que facilitan la misma. También es posible hacer un análisis cuantitativo de mezclas cristalinas midiendo las intensidades de las líneas de difracción y comparándolas con patrones.

En la actualidad, la difracción de rayos X con polvo cristalino, a temperatura programada, está teniendo una especial atención en el estudio de materias primas farmacéuticas, ya que entre otras posibilidades, permite detectar transiciones polimórficas que a veces no son detectadas empleando otras técnicas tales como la calorimetría diferencial de barrido. (Broquaire, 1995; Girón, 1986)

5. Calorimetría Diferencial de Barrido

Los análisis térmicos comprenden un grupo de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia y/o sus productos de reacción en función de la temperatura, mientras la sustancia se somete a un programa de temperatura controlado (Valls, 1998). Su aplicación tanto en la investigación como en el control de calidad de distintos materiales, abarca diferentes industrias como la farmacéutica, la de polímeros y la metalúrgica, entre otras.

a) Termogravimetría

Entre los métodos de mayor difusión se encuentran la termogravimetría (TG), el análisis térmico diferencial (DTA) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). La *termogravimetría* se basa en el registro continuo de la masa de la muestra, colocada en una cámara con atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo, al ir aumentando la temperatura de la muestra. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma o curva de descomposición térmica.

Los instrumentos para análisis por TG constan en general de una balanza analítica sensible, un horno, un sistema de purga de gas para proporcionar una atmósfera inerte o reactiva -según sea el caso-, y un microprocesador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de los datos. En algunos aparatos, además existe la posibilidad de acoplar un sistema para cambiar el gas de purga durante el estudio.

La *termogravimetría* está limitada en su mayor parte a ensayos que implican reacciones de descomposición y de oxidación, así como a procesos tales como la vaporización, la sublimación y la desorción.

Una de las aplicaciones más importantes de esta técnica se da en el análisis de polímeros, donde los patrones de descomposición son característicos de cada tipo de polímero, asimismo, permite identificar polímeros que han sido sometidos a distintos tratamientos con otras sustancias, con el fin de modificar sus propiedades.

Otra de las aplicaciones más difundidas de la TG en Farmacia, es la identificación de solvatos e hidratos, ya que muchos de los excipientes inorgánicos y orgánicos se pueden obtener como sustancias anhidras o con distintos grados de hidratación o solvatación.

b) Análisis térmico diferencial

El *análisis térmico diferencial* (DTA) es una técnica en la que se mide la diferencia de temperatura entre una sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el patrón de referencia se someten a un programa de temperatura controlado.

Por lo general, en el DTA el programa de temperatura implica el calentamiento de la muestra y del material de referencia, de manera que la temperatura de la muestra aumenta linealmente con el tiempo. La diferencia de temperatura ΔT entre la temperatura de la muestra T_m y la temperatura de la sustancia de referencia T_r , se controla, para obtener un gráfico donde se representa ΔT frente a la temperatura de la muestra, denominado termograma diferencial.

El DTA también es una herramienta de gran utilidad en el estudio y caracterización de polímeros, así como en estudios sobre el comportamiento térmico de compuestos inorgánicos como silicatos, ferritas, arcillas, óxidos, cerámicas, catalizadores, vidrios, entre otros, obteniéndose información sobre procesos tales como la desolvatación, fusión, deshidratación, oxidación, reducción y adsorción (Valls, 1998). También esta técnica proporciona una manera sencilla y exacta para determinar los puntos de fusión, ebullición y descomposición de compuestos orgánicos, que los obtenidos por las técnicas tradicionales de la placa caliente o por tubo capilar.

c) Calorimetría diferencial de barrido

Por otra parte, la *calorimetría diferencial de barrido* (DSC), es una técnica en la que se mide las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una referencia, en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado. La diferencia básica entre la DSC y el DTA consiste en que el primero es un método calorimétrico en el que *se miden diferencias de energía*, y por el contrario, en el DTA se registra las *diferencias de temperatura*. (Valls, 1998)

En análisis por DSC se utilizan dos tipos de métodos: el *DSC de potencia compensada* y el *DSC de flujo de calor*. En el primero, la muestra y el material de referencia se calientan por calentadores separados, aunque sus temperaturas se mantienen

iguales mientras la temperatura en ambas se aumenta o disminuye linealmente. En el segundo, se mide la diferencia en cantidad de calor que fluye hacia la muestra y hacia la referencia cuando la temperatura de la muestra se aumenta o disminuye linealmente. No obstante que ambos métodos proporcionan la misma información, la instrumentación de los dos es diferente.

El instrumento de *DSC de potencia compensada* tiene dos hornos independientes, uno para el calentamiento de la muestra y otro para el calentamiento de la referencia. Por lo general, los equipos comerciales disponen de hornos pequeños, de alrededor de un gramo de peso cada uno, permitiendo velocidades de calentamiento, enfriamiento y de equilibrio, muy elevadas. Sobre los hornos se encuentran los respectivos soportes de la muestra y de la referencia, los cuales tienen insertados termómetros de resistencia de platino para controlar de manera continua la temperatura de ambos materiales.

Para obtener las curvas térmicas diferenciales en el DSC de potencia compensada, el instrumento dispone de dos circuitos de control, uno para el manejo de la temperatura promedio y el otro para el control de la temperatura diferencial, de modo que en el circuito de manejo o control de la temperatura promedio, el programador del equipo proporciona una señal eléctrica que es proporcional a la temperatura promedio deseada en los soportes de la muestra y de la referencia, en función del tiempo.

En un ordenador se compara la señal eléctrica que corresponde a la temperatura promedio deseada en los dos soportes -de la muestra y de la referencia-, con el promedio de las señales enviadas por los detectores de la muestra y de la referencia. Así, cualquier diferencia entre la señal del programador y la señal promedio de los sensores de platino, se utiliza para ajustar automáticamente la temperatura promedio de la muestra y de la referencia, sirviendo la temperatura promedio del programador como abscisa de la curva térmica diferencial obtenida. En el circuito de temperatura diferencial, las señales de los sensores de resistencia de platino de la muestra y de la referencia alimentan un amplificador diferencial, por medio de un circuito de comparación que determina cuál es mayor. La salida del amplificador ajusta de esa manera la potencia de entrada de los dos hornos, de forma que sus temperaturas se mantengan idénticas y así, durante el ensayo la muestra y la referencia son isotermas. Una señal que es proporcional a la diferencia en la potencia de entrada a los dos hornos, se transmite al sistema de adquisición de datos y esta diferencia, expresada en miliwatios (mW), es la información que se representa con más frecuencia en el eje de las ordenadas en un gráfico de DSC obtenido mediante este sistema de potencia compensada. En un instrumento de *DSC de flujo de calor*, la energía calorífica fluye tanto hacia la muestra como hacia el material de referencia mediante un disco termoeléctrico de constantan o de Chromel® (aleaciones de 60% cobre y 40% níquel para el primer caso, y algunas veces hierro, tratándose del segundo), calentado eléctricamente. Se utilizan pequeños platillos o crisoles de aluminio tanto para la muestra como la referencia, los cuales se colocan sobre plataformas formadas en el disco de constantan. El calor se transfiere mediante el disco hacia la muestra y la referencia a través de los crisoles de aluminio y la diferencia entre el flujo de calor hacia la muestra y la referencia se controla mediante unos termopares de superficie hechos de Chromel/constantan, formados por la

unión entre la plataforma de constantan y los discos de Chromel® sujetos a la parte inferior de la plataforma.

La diferencia entre la cantidad de calor que fluye hacia los dos crisoles es directamente proporcional a la diferencia en la salida en las dos uniones del termopar, y la temperatura de la muestra se estima por la unión Chromel/alumel colocada debajo del disco de la muestra. La representación gráfica del aporte de calor como potencia diferencial en mW, en función de la temperatura promedio (en grados Celsius) del sistema, proporciona curvas de DSC similares a las que se obtienen mediante el sistema de potencia compensada.

Por lo general, los experimentos calorimétricos diferenciales de barrido se efectúan en la modalidad de barrido de temperatura, pero también se pueden realizar ensayos isotérmicos, en los que se observa los cambios en la potencia diferencial en función del tiempo, a una temperatura constante, como puede ser el caso de la observación del tiempo necesario para que a una temperatura constante, se desarrolle la cristalización de un material polimérico y donde el área bajo el pico obtenido, representa el grado de cristalización que haya tenido lugar.

La calorimetría diferencial de barrido ha venido cobrando especial interés en la investigación y control de calidad de materiales y productos farmacéuticos, ya que permite entre otros, la determinación de la pureza absoluta de materias primas, la identificación de estados amorfos o la existencia de polimorfismo y la determinación de sus parámetros termodinámicos tales como el calor de fusión.

Mediante el ensayo por DSC de un material, además de la determinación de su temperatura de fusión, ebullición y sublimación, es posible identificar también fenómenos de oxidación, descomposición e isomerización y cambios que pueden ocurrir en los materiales después de períodos de almacenamiento o después de ser sometidos a procesos como la aglomeración, la compresión, el secado por atomización y al permanecer en suspensión. Por lo cual puede ser una herramienta útil para el control en proceso en la elaboración de medicamentos.

En las fases de preformulación y desarrollo de medicamentos, los ensayos por DSC también permiten detectar incompatibilidades fármaco-excipientes o excipientes-excipientes y con materiales de envase.

6. Espectrofotometría UV-Visible

La espectrofotometría consiste en la medida de la absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones descritas a continuación se extiende desde las cortas longitudes de onda de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro.

Para mayor comodidad en las referencias, este intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta (190 nm – 380 nm) y la visible (380 nm – 783 nm). La espectrofotometría en la zona visible (antes solía llamarse colorimetría) es la medida de la absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia. Los espectros ultravioleta y visible de una sustancia no tienen, en general, un alto grado de especificidad. Sin embargo, son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias, constituyen un medio útil adicional de identificación.

Los términos siguientes, empleados en relación con las pruebas espectrofotométricas en la farmacopea, (FEUM) se definen:

Absorbancia (A): Logaritmo decimal del inverso de la transmitancia (T). El término “densidad de transmisión interna” puede emplearse como sinónimo de absorbancia. Entre las expresiones descriptivas usadas anteriormente figuran densidad óptica y extinción.

Transmitancia (T): Relación entre el flujo de radiación transmitido por la sustancia problema y el flujo de radiación incidente.

Absortividad (a). Cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en gramos por litro, y el espesor atravesado por la energía luminosa (b) expresado en centímetros ($a = A/bc$). Dos expresiones estrechamente relacionadas con la absortividad son: extinción específica y coeficiente de la absorción específica.

La expresión “extinción específica” (ϵ %¹ cm) tal como se emplea generalmente en las farmacopeas, se aplica al cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (b) expresada en gramos por 100 mL y el espesor atravesado (b) por la energía luminosa expresado en centímetros.

La expresión “coeficiente de absorción específica”, se define como el cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración (c) y el espesor atravesado por la energía luminosa (L); cuando se utiliza el símbolo así para el coeficiente de absorción específica, que en el sistema internacional se expresa en m^2/kg .

El término “absortividad” no debe confundirse con las expresiones índice de absorbancia o coeficiente de extinción.

Absortividad molar (E): Cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en moles por litro, y el espesor atravesado energía luminosa (b) expresado en centímetros. Es también el producto de la absortividad (a) por el peso molecular de la sustancia.

La expresión “coeficiente de absorción molar (lineal)” se define como el cociente de dividir la densidad de transmisión interna (absorbancia) de la sustancia entre el producto de la concentración de la sustancia y el espesor atravesado por la energía luminosa, y según el

SI, debe expresarse en metros cuadrados por mol.

Las expresiones anteriormente usadas para expresar la absorptividad molar eran índice de absorbancia molar y coeficiente de extinción molar.

Espectro de absorción: Relación entre la absorbancia y la longitud de onda a cualesquiera funciones de éstas, representada en forma gráfica.

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visible y ultravioleta como procedimiento de valoración se basa en el hecho de que, la absorptividad de una sustancia suele ser una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, la longitud interior de la cubeta y la concentración, por lo cual la concentración se puede determinar espectrofotométricamente.

Las desviaciones de lo dicho en el párrafo anterior pueden ser causadas por variables de origen físico, químico o instrumental. Las desviaciones causadas por un error instrumental pueden deberse a variaciones en la abertura de la rendija, luz extraña o radiación policromática.

Ciertos errores pueden deberse también a cambios de concentración en las moléculas del soluto producidos por asociación entre ellas mismas o entre ellas y moléculas del disolvente, así como disociación o ionización.

Aparatos: Básicamente todos los tipos de espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática a través de la sustancia problema, convenientemente preparada y hagan posible la medición de la fracción de radiación transmitida.

El espectrofotómetro consta de una fuente de energía, de un sistema dispersivo con rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda, una celda o recipiente para la sustancia problema, un detector de la energía radiante y dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro.

Algunos instrumentos se manejan manualmente, mientras que otros están provistos de sistemas automáticos. Hay instrumentos utilizables en la región visible del espectro, por lo general entre 380 nm y 700 nm y en las regiones visibles y ultravioleta, generalmente entre 190 nm y 700 nm.

Se encuentran instrumentos de un solo haz y de doble haz y ambos son igualmente útiles. Según el tipo de aparato que se emplee, los resultados pueden hacerse visibles en una escala o en un registrador digital y quedar registrados o impresos.

El aparato debe mantenerse en buenas condiciones de funcionamiento, el sistema óptico ha de estar alojado de manera que se reduzcan al mínimo las posibilidades de errores causados por la luz extraña o parásita, lo cual reviste particular importancia en la zona de ondas cortas del espectro.

Las celdas que suelen emplear en la zona espectral que aquí se trata son celdas de absorción de 1 cm de vidrio para la región visible o de sílice para la región UV con las ventanas. También pueden emplearse otros espesores. Las celdas utilizadas para la solución problema y para el blanco deben tener la misma transmitancia espectral cuando sólo contienen el disolvente, de lo contrario habrá que hacer la corrección apropiada. (FEUM)

7. Opalinidad

Esta prueba se basa en la comparación visual del aspecto de la muestra en solución contra patrones de referencia bajo condiciones establecidas. Se fundamenta en la valoración de la presencia de partículas insolubles, como un remanente del proceso de liofilización, las cuales se observan al mezclar el producto liofilizado con un disolvente.

Para sustentar esta prueba y tratar de darle criterio cuantitativo, en este trabajo se propuso la determinación de la absorbancia de cada una de la muestras (a sus longitudes de máxima absorbancia 200 nm y a 280 nm) para su posterior comparación entre sí.

8. Tiempo de Reconstitución

Esta prueba se basa en la reconstitución del producto con 5 mL de agua e inmediatamente se coloca en un sistema de agitación mecánico y se determina el tiempo en que se disuelve totalmente el polvo.

I. CRITERIOS DE CALIDAD DEL PRODUCTO LIOFILIZADO.

1. Especificaciones y Normas

Los anteriores criterios de calidad deberán de ser cumplidos por todos aquellos laboratorios que fabriquen, distribuyan o vendan Vancomicina polvo, para solución inyectable de 500 mg de principio activo:

a) Apariencia de la pastilla (taquete).

El aspecto del taquete deberá tener consistencia uniforme y libre de partículas extrañas. (Norma IMSS clave 4251)

b) Velocidad de reconstitución.

El tiempo en que se disuelve totalmente el polvo deberá ser menor a 1 minuto. Esta es una especificación Interna considerada apropiada para este producto.

c) Valoración.

El producto deberá de tener una valoración de 500 mg de Vancomicina Clorhidrato determinada microbiológicamente. Con un margen entre el 90 al 115 de potencia. (Norma IMSS clave 4251)

d) Contenido de agua. (Humedad)

No más de 5.0 %, (FEUM 7ª Edición, IMSS clave 4251)

e) pH.

De 2.5 a 4.5 (FEUM 7ª Edición)

f) Solubilidad y transparencia de la solución reconstituída.

La solubilidad debe ser completa. La solución reconstituída debe ser tan clara como un volumen igual de agua y libre de partículas visibles. (Norma IMSS clave 4251)

g) Identificación.

Espectro IR con bandas conforme al estándar (FEUM 7ª Edición, IMSS, clave 4251)

h) Esterilidad.

Cumple con los requisitos. (Norma IMSS, clave 4251)

i) Pirógenos.

Cumple con los requisitos. (Norma IMSS, clave 4251)

j) Seguridad.

Cumple con los requisitos. (Norma IMSS, clave 4251)

III. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad, el desarrollo de formas farmacéuticas es un proceso que requiere la aplicación de un amplio conjunto de disciplinas científicas, junto con un diseño experimental que emplee un menor número de ensayos, basados en herramientas numéricas como la estadística (diseño de mezclas) y analíticas como la espectroscopia infrarroja, la calorimetría diferencial de barrido y la difracción de rayos X, entre otras, que permiten al investigador farmacéutico entender mejor los procesos físicos y químicos involucrados en el diseño de los medicamentos.

En este ámbito, una de las formas farmacéuticas que requiere mayor atención durante su desarrollo, por su complejidad, son los productos liofilizados. Estos requieren de experimentos muy precisos para poder definir los excipientes que acompañarán a la formulación, el volumen de disolvente a liofilizar, las tasas de enfriamiento, el punto eutéctico (o rango eutéctico), la temperatura de congelamiento, el vacío aplicado durante el secado primario, la temperatura en el secado primario, el vacío y la temperatura del secado secundario. Todos estos factores son importantes y definirán las características de calidad del producto final.

A pesar de lo anterior, el desarrollo de productos liofilizados en el ámbito industrial farmacéutico en México, es incipiente, ya que generalmente se reproducen procesos desarrollados en el extranjero por la empresa matriz o bien se realiza de manera empírica, dependiendo en gran medida de la habilidad y experiencia del formulador.

En la actualidad, uno de los productos liofilizados existentes en el mercado que tienen Vancomicina, en presentación de 500 mg, presenta problemas en cuanto a dos características de calidad: 1) aspecto del liofilizado (uniformidad del color del taquete o pastilla) y 2) opalinidad (característica que es función de la solubilidad del total de los componentes de la formulación), por lo cual es importante efectuar, de ser necesario, una reformulación del producto y/o una optimización del proceso de liofilización con la finalidad de mejorar estos atributos de aceptación.

El aporte de este trabajo será elucidar las variables de proceso de liofilización que determinan el aspecto del liofilizado, identificando asimismo si dichos cambios son el resultado de una modificación física y/o química de la mezcla sólida, evaluable mediante la caracterización de la morfología y la estructura interna del sólido formado, así como de su efecto sobre la opalinidad del producto reconstituido.

Consecuentemente, en este trabajo se pretende evaluar a partir de un modelo experimental, cuáles son los factores que presentan mayor influencia en las características físicas y fisicoquímicas de un producto farmacéutico liofilizado, con el fin de poder optimizar una formulación y de ser posible su proceso de producción, para obtener un medicamento que cumpla con las especificaciones de calidad establecidas por las principales farmacopeas y normas para productos liofilizados.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cambio de las variables del proceso de liofilización, como son: tasa de enfriamiento, tasa de calentamiento y temperatura de secado secundario, determinarán el estado de agregación molecular y la morfología del sólido obtenido, así como las características de calidad del producto liofilizado, entre las que se encuentran la velocidad de disolución, la opalinidad de la solución y la potencia microbiológica.

V. OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto de las variables de proceso temperatura y/o tiempo de congelación, sublimación y desecación, durante la liofilización de la vancomicina.
2. Evaluar las características de calidad del producto: apariencia de la pastilla, velocidad de reconstitución, opalinidad del reconstituido y potencia microbiológica.
3. Caracterizar mediante técnicas analíticas instrumentales (DSC, IR y Microscopía Óptica), la morfología y estado cristalino del producto liofilizado.
4. Establecer un ciclo de liofilización, bajo el cual se obtengan las mejores características de calidad, para el fármaco vancomicina clorhidrato en presentación de pastilla liofilizada de 500 mg,

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. MATERIALES Y EQUIPO:

1. Reactivos y Materiales

Vancomicina clorhidrato USP ALCHIM 98.5 %
Lactosa USP lote G
Solución salina
Agua destilada GR grado inyectable
Organismo de Prueba: *Bacillus subtilis* ATCC 6633
Solución amortiguadora: Buffer de Fosfato 0.1 M, pH 4.5
Medios de cultivo: Medios Nos. 2 y 8 FEUM

Material de vidrio de uso general en laboratorio
Cilindros de acero inoxidable, 8 +/- 0.1 mm de diámetro externo, 6 +/- 0.1 mm de diámetro interno y 10 mm de largo
Pinzas para penicilindros
Cápsulas de aluminio de 40 µL con tapa para DSC.
Frasco de Vidrio claro Tipo tubo de 25 mL boca 20 mm
Tapón de Bromobutilo Tipo doble ventana de 20 mm
Sello tipo Flip Off color Rojo de 20 mm

2. Equipo

Microscopio Óptico Zeiss
Espectrofotómetro Infrarrojo (IR) marca Nicolet Avatar 360 FF
Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) Shimadzu
NIR (Infrarrojo Cercano)
Equipo para determinación de Humedad por Karl Fisher 737 KF
Equipo para determinación de Velocidad de Reconstitución sistema de agitación en rodillo marca Mayasa
Espectrofotómetro UV/Visible Unicam UV-Visible Spectrometry Vision 32
Estufa de Incubación Cole-Palmer
Vernier marca Sumitomo
Engargoladora Manual Cole Palmer boca 20 mm
Liofilizadora PilotLyo (Usifroid)
Parrillas de Agitación Thermolyne 200
Agitador IKA Works RW 16 con propela
Matraz de Fabricación de 1.0 Litro Pyrex
Dosificadora con jeringa de 5.0 mL Cole Palmer
Sistema de filtración Millipore de 143 mm
Membrana estéril Millipore de 0.22 µ y 143 mm de diámetro

B. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Descripción de Métodos

a) Identificación y caracterización de las materias primas:

1.1 Espectroscopía Infrarroja

Preparación del Estándar.

Pesar una cantidad de 10 mg de estándar de clorhidrato de vancomicina y lactosa, colocarlos en un mortero de ágata y dispersar en 100 mg de bromuro de potasio, cada muestra, previamente secado, triturar suavemente y mezclar con ayuda de un pistilo.

Preparación de la Muestra.

Preparar de manera similar a la preparación del estándar (10 mg de muestra en 100 mg de bromuro de potasio).

Procedimiento.

Colocar bromuro de potasio seco y molido en uno de los orificios del porta muestra y determinar el espectro blanco en el intervalo de 3800 cm^{-1} a 650 cm^{-1} ($2.6\text{ }\mu\text{m}$ y $15\text{ }\mu\text{m}$). Limpiar el portamuestra y colocar la preparación del estándar, determinar su espectro.

Comparar los espectros de la muestra y estándar. La prueba de identidad es correcta si bajo las mismas condiciones, el porcentaje de comparación en el espectro es mayor al 80 % y el espectro de absorción de la muestra presenta máximos solo a las mismas longitudes de onda que el estándar.

Se utilizará la técnica de dispersión en bromuro de potasio para la evaluación del estado de agregación molecular del estado sólido.

1.2 Comportamiento térmico por DSC

Realizar calentamientos sucesivos de las muestras a una tasa de calentamiento de 5°C por minuto hasta alcanzar los 200°C . Posteriormente, a 2°C por minuto hasta los 240°C ; manteniendo una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 30 mL/minuto . Posteriormente compararlos contra un estándar y entre sí.

Las muestras consisten en:

Vancomicina materia prima, lactosa materia prima, mezcla de lactosa-vancomicina, y muestras liofilizadas.

1.3 Cristalinidad y morfología

Suspender unas cuantas partículas de la muestra en parafina líquida sobre un portaobjetos perfectamente limpio. Observar la muestra por medio de un microscopio con lentes condensadores de luz.

Interpretación.

Los cristales de la muestra deben de exhibir birrefringencia, que se extingue a medida que el tornillo de la platina del microscopio se hace girar. En su caso, describir el hábito del cristal de conformidad al método general de análisis de cristalinidad establecido por la USP 25.

1.4. Tiempo de reconstitución

Reconstituir el contenido de 10 frascos y colocar en el equipo de rodillos giratorios, encender el equipo a la velocidad indicada como No.5 y permitir el giro del mismo. Determinar con un cronómetro el tiempo en que ya no se observa ninguna partícula sin disolverse.

1.5. Opalinidad

Preparación del patrón de referencia.

Pesar exactamente 1 gramo de sulfato de hidrazina, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con agua, dejar reposar de 4 a 6 horas. A 25 mL de la solución anterior, adicionar 25 mL de una solución que contenga 2.5 g de hexamina en 25 mL de agua, mezclar perfectamente y dejar reposar durante 24 horas. Esta suspensión es estable durante 2 meses conservándola en un recipiente de vidrio de superficie lisa. Transferir 15 mL de la suspensión anterior a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar al aforo con agua. Esta suspensión debe ser usada dentro de las 24 horas siguientes de la preparación.

Esquema de preparación

<i>Suspensión de Referencia</i>				
	I	II	III	IV
Patrón de Referencia (mL)	5.0	10.0	30.0	50.0
Agua (mL)	95.0	90.0	70.0	50.0

Cada suspensión se debe mezclar y agitar perfectamente antes de su uso.

Preparación de la muestra.

Reconstituir 5 frascos del producto liofilizado con agua grado inyectable y agitar durante 2 minutos. Transferir por separado a 2 tubos Nessler de 15 mm a 20 mm de diámetro, la cantidad suficiente de la solución de la muestra y de la suspensión de referencia exactamente medidas para obtener una profundidad de 40 mm en ambos tubos, 5 minutos después de la preparación de la suspensión de referencia, comparar el contenido de los tubos de prueba bajo la luz difusa en plano vertical sobre un fondo negro manteniéndose separados entre sí por una distancia de 3 cm a 5 cm. La difusión de la luz debe ser tal que, la suspensión de referencia I pueda ser fácilmente distinguida del agua y de la suspensión de referencia II.

Interpretación.

La solución es clara, si la opalescencia no es más intensa que la suspensión de referencia I (estándar 1). La solución es ligeramente opalescente, si su opalescencia está

entre la suspensión de referencia I y la suspensión de referencia II (estándar 2). La solución es opalescente, si su opalescencia está entre la suspensión de referencia II y la suspensión de referencia III. La solución es muy opalescente, si su opalescencia está entre la suspensión de referencia III (estándar 3) y la suspensión de referencia IV (estándar 4).

El resultado idóneo para la vancomicina es aquel que en la observación visual la muestra es igual al diluyente.

1.6 Valoración microbiológica de vancomicina a partir del liofilizado

Método:	Cilindro en placa
Cilindros:	De acero inoxidable, 8 +/- 0.1 mm de diámetro externo, 6 +/- 0.1 mm de diámetro interno y 10 mm de largo
Organismo de Prueba:	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Buffer:	Buffer de Fosfato 0.1 M, pH 4.5
Medios de cultivo:	Medios Números. 2 y 8
Temperatura incubación:	30 a 35°C
Periodo de incubación:	18 a 24 horas
Espectrofotómetro:	Shimadzu

Organismo de prueba:

Bacillus subtilis ATCC 6633

Resembrar el microorganismo un día antes de la prueba. Incubar a 30-35°C durante 18 - 24 horas. Colectar el crecimiento con 10 mL de solución salina estéril. Ajustar a 25 % de transmitancia.

Preparación de la solución reguladora de fosfato de potasio 0.1 M pH 4.5

Disolver 13.61 g de fosfato monobásico de potasio en 1000 mL de agua destilada. Ajustar el pH con solución de ácido fosfórico 18 N ó con solución de hidróxido de potasio 10 N a un valor de 4.5 ± 0.05 .

Medio de cultivo No. 2 (Capa Base)

Utilizar medio de cultivo deshidratado comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. La composición del medio debe ser la siguiente: peptona 6.0 g, extracto de levadura 4.0 g, extracto de carne 1.5 g, agar 15.0 g en agua 1000 mL. Esterilizar por vía húmeda. Ajustar el pH 6.6 ± 0.1 .

Medio de cultivo No. 8 (Capa Siembra)

Utilizar medio de cultivo deshidratado comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. La composición del medio debe ser la siguiente: peptona 6.0 g, extracto de levadura 4.0 g, extracto de carne 1.5 g, agar 15.0 g en agua 1000 mL. Esterilizar por vía húmeda. Ajustar el pH 5.9 ± 0.1 .

Preparación de la solución stock del estándar.

Pesar con exactitud una cantidad de clorhidrato de vancomicina sustancia de referencia equivalente a 25 mg de vancomicina, transferirlos a un matraz volumétrico de 25

mL, disolver y llevar a volumen con agua, esta solución contiene 1 mg/mL de vancomicina y es estable en refrigeración por un período de 7 días.

Preparación de la solución de referencia de trabajo:

Tomar 10 mL de la solución stock y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL. Aforar con la solución reguladora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 4.5. Esta solución contiene 100 µg/mL de vancomicina.

Preparar las siguientes diluciones a partir de la solución de trabajo, aforar con la solución reguladora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 4.5 y mezclar.

6.4 mL a 100 mL para obtener 6.4 µg/mL. Solución A.

8.0 mL a 100 mL para obtener 8.0 µg/mL. Solución B.

10.0 mL a 100 mL para obtener 10.0 µg/mL. Solución C.

12.5 mL a 100 mL para obtener 12.5 µg/mL. Solución D.

15.6 mL a 100 mL para obtener 15.6 µg/mL. Solución E.

Preparación de la solución muestra:

Pesar una cantidad de muestra equivalente a 25 mg de vancomicina y transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y aforar con agua, mezcle. Transferir 10 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con la solución reguladora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 4.5 y mezclar. Tomar 10 mL de la solución anterior y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con la solución reguladora.

Colectar el crecimiento con 10 mL de solución salina estéril y homogeneizar hasta obtener una suspensión. Leer la transmitancia de la suspensión a 580 nm en un espectrofotómetro y ajustar la suspensión hasta obtener una lectura de 25 % +/- 0.3 %. Usar solución salina estéril como blanco.

Volumen de inoculación:

1 mL de la suspensión del microorganismo (ajustada a 25 % de transmitancia) por cada 100 mL de medio (capa siembra).

Temperatura de incubación:

30 - 35°C.

Procedimiento:

Adicionar 10 mL de la capa base a cada caja Petri y esperar a que solidifique. Adicionar 4 mL de la capa siembra (medio inoculado) a cada una de las cajas y espere a que solidifique. Colocar 6 cilindros en cada caja sobre el medio inoculado y adicionar la solución muestra y las diluciones de referencia alternadamente con la dilución central. Repetir 3 veces para las diluciones de la curva estándar y la solución muestra. Incubar las cajas a 30-35°C durante 18 a 24 horas.

Después de transcurrido este tiempo, determinar la zona de inhibición de crecimiento. Con los valores medidos obtener la curva estándar y calcule los μg de Vancomicina por mg de muestra con la fórmula:

$$\text{Valores interpolados } (\mu\text{g/mL}) \times \text{Factor de dilución}$$

Solución de referencia concentrada:

Pesar con exactitud una cantidad de clorhidrato de vancomicina sustancia de referencia, equivalente a 25 mg de vancomicina, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con agua. Almacenar en refrigeración y usar dentro de un periodo de 7 días. Tomar 10 mL de la solución anterior y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL. Aforar con la solución reguladora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 4.5. Esta solución contiene 100 μg de vancomicina/mL. Preparar las siguientes diluciones de la solución anterior con la solución reguladora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 4.5.

6.4 mL a 100 mL para obtener 6.4 $\mu\text{g/mL}$.	Solución A
8.0 mL a 100 mL para obtener 8.0 $\mu\text{g/mL}$.	Solución B
10 mL a 100 mL para obtener 10 $\mu\text{g/mL}$.	Solución C
12.5 mL a 100 mL para obtener 12.5 $\mu\text{g/mL}$.	Solución D
15.6 mL a 100 mL para obtener 15.6 $\mu\text{g/mL}$.	Solución E

Solución muestra:

Reconstituir 5 frascos del liofilizado de vancomicina 500 mg con 10 mL de agua inyectable cada uno. Hacer una mezcla compuesta y transferir 1 mL de ésta a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con agua inyectable. Concentración: 1 mg/mL de vancomicina.

Transferir 1 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con la solución reguladora de Fosfato de Potasio 0.1 M, pH 4.5 y mezclar. Esta solución contiene 10 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina.

Procedimiento:

Adicionar 8 mL de la capa base a cada caja Petri y esperar a que solidifique. Adicionar 6 mL de la capa siembra (medio inoculado) a cada una de las cajas y esperar a que solidifique. Colocar 6 cilindros en cada caja sobre el medio inoculado y adicionar la solución muestra y las diluciones de referencia alternadamente con la dilución central. Repita 3 veces para las diluciones de la curva estándar y la solución muestra.

Incubar las cajas a 30-35°C durante 18 a 24 horas. Después de transcurrido este tiempo, medir la zona de inhibición de crecimiento.

Con los valores medidos obtener la curva estándar y calcular los mg de vancomicina por frasco con la fórmula:

Valores interpolados (mg/mL) x factor de dilución.

1.7 Apariencia del taquete (pastilla) liofilizado (altura, grosor y superficie transversal)

Para esta prueba se observan 10 frascos de muestra bajo condiciones adecuadas de visibilidad y describiendo el contenido y el envase primario.

La altura y grosor de la pastilla fueron medidas mediante un Vernier.

1.8 Contenido de agua por Karl Fisher.

Transferir el contenido de un frasco de vancomicina de 500 mg a un vaso de titulación que contenga aproximadamente 50 mL de metanol el cual previamente ha sido titulado con el reactivo de Karl Fisher al punto final. Agitar hasta la disolución y titular con el reactivo de Karl Fisher al punto final.

Calcular el contenido de agua en la muestra por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de agua} = SF/M$$

En donde:

S Es el volumen en mL de reactivo consumido

F Es el factor de equivalencia del reactivo x 100

M Es el peso de la muestra en miligramos

Nota: esta prueba se realiza por triplicado para cada placa.

1.9 Determinación del pH de la solución reconstituida.

Preparación de la muestra.

Usar la solución obtenida de 2 frascos reconstituidos con agua para inyectables.

Procedimiento.

Verificar que el potenciómetro se encuentra calibrado, de no ser así efectuar la calibración. Enjuagar el electrodo con agua destilada y con unas porciones de la preparación de la muestra, sumergir el electrodo dentro del recipiente de la muestra y determinar el pH.

2.10 Determinación de la absorbancia a 200 nm y 280 nm.

Reconstituir cada muestra con 5 mL de agua. Para la determinación a 200 nm se deberán realizar una dilución de la muestra de 1mL en 500 mL de agua. Para la determinación de la absorbancia a 280 nm se deberá de realizar una dilución de 1mL en 100 mL de agua.

2. Fases Experimentales

2.1 Etapa 1. Control de la calidad de las materias primas

Se realizó la identificación y caracterización de las materias primas, así como su aceptación para ser utilizados en el proyecto.

Los materias primas son:

Vancomicina clorhidrato Lote : C 1562 MP

Lactosa monohidratada USP Lote: G

2.2 Etapa 2. Diseño estadístico para la optimización del proceso de liofilización

De acuerdo a estudios preliminares con respecto a este producto, se ha establecido que un ciclo de 40 horas es suficiente para conseguir la humedad deseada, (HR %) por lo que los niveles de factor propuestos son:

Variables:

a) Tasa de Enfriamiento (2 pendientes) (X_1)

Se establecieron dos tasas de enfriamiento, una alta (+) y una baja (-), que constituyen los niveles de factor en el diseño experimental; para el primer caso, el nivel alto, se llevó el producto hasta -45°C a una tasa de congelamiento de $15^{\circ}\text{C}/\text{hora}$. Y para el segundo caso, el nivel bajo, se realizó un congelamiento hasta -40°C a una tasa de congelamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{hora}$ (-). En ambos casos la temperatura mínima se mantuvo durante 2 horas.

b) Tasa de Sublimación (2 pendientes) (X_2)

Se establecieron dos tasas de sublimación, una alta (+) y una baja (-), que constituyen los niveles de factor en el diseño experimental; para el primer caso, el nivel alto, la tasa de sublimación fue de $5^{\circ}\text{C}/\text{hora}$. Y para el segundo caso, el nivel bajo, se efectuó una tasa de congelamiento de $3^{\circ}\text{C}/\text{hora}$ (-).

c) Temperatura de Secado Secundario (2 Temperaturas) (X_3)

Se establecieron dos temperaturas de secado secundario, una alta (+) y una baja (-), que constituyen los niveles de factor en el diseño experimental; para el primer caso, el nivel alto, la temperatura fue de 40°C , y para el segundo caso, el nivel bajo, la temperatura fue de 30°C (-). Ambas temperaturas se mantuvieron durante 20 horas.

d) Presencia de Soporte (Lactosa) (X_4)

Se utilizó un soporte (lactosa) en una concentración de 100 mg para el caso de presencia de soporte se codificó como nivel alto (+) y, para la ausencia de soporte, como el nivel bajo (-).

Los niveles de factor codificados como 0 (puntos centrales), fueron calculados como puntos intermedios para cada experiencia, es decir, para la tasa de enfriamiento fue de 12.5°C/hora; para la tasa de sublimación de 4°C/hora, para secado secundario de 35°C y para presencia de soporte de 50 mg.

El diseño exploratorio estadístico propuesto es un factorial 2^4 con puntos centrales (4) que genera la siguiente matriz de experimentación con los niveles de factores codificados y aleatorizados, (Tabla 1).

En el diseño la inclusión de los 4 puntos centrales fue para tratar de determinar la presencia de curvatura (no linealidad)

Cada experimento se realizó con 150 frascos acomodados en la liofilizadora en 3 placas de 50 frascos cada una. (apéndice B)

Es importante señalar que antes de realizar las pruebas de liofilización se realizó la calificación del equipo (Pilotlyo) de acuerdo al *apéndice A*.

Valores Codificados de X					
No. de Exp.	X_1	X_2	X_3	X_4	Orden del Exp.
1	-	-	-	-	9
2	+	-	-	-	2
3	-	+	-	-	10
4	+	+	-	-	8
5	-	-	+	-	6
6	+	-	+	-	4
7	-	+	+	-	1
8	+	+	+	-	7
9	-	-	-	+	18
10	+	-	-	+	12
11	-	+	-	+	19
12	+	+	-	+	13
13	-	-	+	+	17
14	+	-	+	+	16
15	-	+	+	+	20
16	+	+	+	+	14
17	0	0	0	0	3
18	0	0	0	0	5
19	0	0	0	0	11
20	0	0	0	0	15

Tabla.1 Matriz de datos experimentales definidas para el diseño factorial 2^4 con puntos centrales para el desarrollo y optimización del proceso de liofilización de Clorhidrato de Vancomicina.

Las condiciones de vacío fueron de 150 μ bar durante sublimación y 100 μ bar en el secado secundario para cada ciclo.

Valores Decodificados de X					
No. de Exp.	X_1 ($^{\circ}$ C/hora)	X_2 ($^{\circ}$ C/hora)	X_3 ($^{\circ}$ C)	X_4 (Soporte)	Orden del Exp.
1	10	3	30	no	9
2	15	3	30	no	2
3	10	5	30	no	10
4	15	5	30	no	8
5	10	3	40	no	6
6	15	3	40	no	4
7	10	5	40	no	1
8	15	5	40	no	7
9	10	3	30	100 mg	18
10	15	3	30	100 mg	12
11	10	5	30	100 mg	19
12	15	5	30	100 mg	13
13	10	3	40	100 mg	17
14	15	3	40	100 mg	16
15	10	5	40	100 mg	20
16	15	5	40	100 mg	14
17	12.5	4	35	50 mg	3
18	12.5	4	35	50 mg	5
19	12.5	4	35	50 mg	11
20	12.5	4	35	50 mg	15

Tabla 2. Matriz de datos experimentales decodificados para el diseño factorial 2^4 con puntos centrales para el desarrollo y optimización del proceso de liofilización de Clorhidrato de Vancomicina.

Etapa 3. Análisis de los liofilizados obtenidos en el diseño experimental.

1. Opalinidad
2. Determinación del contenido de humedad
3. Descripción de la morfología del sólido (Cristalino/amorfo)
4. Velocidad de reconstitución
5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)
6. NIR (infrarrojo cercano)
7. IR
8. Determinación de absorbancia (200 nm y 280 nm)
9. Valoración

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Del diseño estadístico empleado (factorial 2^4 con cuatro repeticiones al centro) se obtuvieron 20 muestras de producto liofilizado; las cuales fueron analizadas de acuerdo a lo establecido en la parte experimental y sus resultados se reportan en la *tabla 3*. Los primeros 8 productos no contienen soporte y los 12 siguientes sí; de tal forma, los primeros 8 liofilizados contienen una concentración de lactosa de 100 mg/vial, y los 4 últimos (puntos centrales), de 50 mg/vial.

Considerando que la valoración es una de las características de calidad mas importantes que debe cumplir el producto liofilizado (determinada ésta como potencia microbiológica), no se encontró que ninguna de las muestras fuera menor al 95 % (límite inferior de aceptación establecido por la Norma).

Por otra parte, en lo concerniente a la prueba de opalinidad, únicamente las muestras correspondientes a los experimentos 1, 5, 9 y 13, dieron una respuesta conforme a la Norma (iguales al diluyente). También estas cuatro muestras presentaron una apariencia del taquete de color blanco. En cuanto a las condiciones del proceso que dieron lugar a estos productos, importante mencionar que se emplearon tasas de congelamiento de 10°C/hora y tasas de sublimación de 3°C/hora (lo cual correspondió, en ambos casos al nivel experimental bajo).

Las muestras con peores resultados de opalinidad (iguales al estándar 2 de la prueba), fueron las correspondientes a los experimentos 8, 16 y 20; y de entre ellos, la primera tuvo el color de taquete menos conveniente (café), y las 2 restantes fueron de color amarillo (*ver imágenes en el apéndice C*). Las muestras 4 y 12, ambas con tasas de congelamiento y sublimación al nivel experimental alto (15°C/hora y 5°C/hora), resultaron poseer un color rosado, lo cual ya ha sido informado con anterioridad que puede ocurrir (Muños G 1999), pero no puede considerarse como una apariencia adecuada para un liofilizado de vancomicina clorhidrato.

En cuanto al número de capas que presentó el taquete; 7 de los liofilizados obtenidos presentaron 2 capas y los 12 productos restantes una sola. En todos los casos, excepto para la muestra 9, la tasa de congelamiento fue de 15°C/hora; lo cual concuerda con la bibliografía donde se indica que estructuras heterogéneas son dependientes de la fase de congelación.

Las pendientes de sublimación y congelamiento fueron calculadas considerando el cambio de temperatura que presentó el producto con referencia a la variación de temperatura de las placas y, como se puede observar en el *apéndice D*, cuando se aplicaron las tasas de congelamiento y sublimación en el nivel experimental bajo, no se observaron grandes diferencias de temperatura entre las placas y el producto (pendientes menores). No ocurrió así con los niveles experimentales altos; por ello se puede considerar que tasas menores de congelamiento facilitan el acomodo de las partículas del material sólido y de los cristales de agua para formar una matriz uniforme; lo cual favoreció en este caso la sublimación del agua durante el secado primario.

1. Resumen de Resultados

Experimento	X ₁ (Congelamiento) °C/hora	X ₂ Sublimación °C/hora	X ₃ Secado Secundario °C	X ₄ Presencia de Soporte	Opalinidad	Valoración (%)	Cristalinidad	Número De Capas	Tiempo de Reconstrucción (Seg)	Pendiente de Congelamiento	Pendiente de Sublimación	Color del Taquete
1	10	3	30	no	Diluyente	99	Amorfo	1	45	-8.40	2.90	Blanco
2	15	3	30	no	Std 1	97	Cristalino	2	50	-9.40	2.84	Amarillo
3	10	5	30	no	Std 1	98.8	Amorfo	1	47	-8.35	4.90	Amarillo
4	15	5	30	no	Entre 1 y 2	97	Cristalino	1	47	-9.70	4.89	Rosado*
5	10	3	40	no	Diluyente	98	Amorfo	1	46	-8.38	3.01	Blanco
6	15	3	40	no	Std 1	98.9	Cristalino	2	47	-9.60	2.95	Amarillo
7	10	5	40	no	Std 1	99.1	Amorfo	1	48	-8.20	4.90	Amarillo
8	15	5	40	no	Std 2	97.5	Cristalino	2	48	-9.65	4.80	Café
9	10	3	30	si	Diluyente	99	Amorfo	2	42	-8.20	2.79	Blanco
10	15	3	30	si	Std 1	98.5	Cristalino	2	48	-9.10	2.80	Amarillo
11	10	5	30	si	Std 1	99.1	Amorfo	1	51	-8.10	4.90	Amarillo
12	15	5	30	si	Std 1	97.9	Amorfo	1	49	-9.20	4.92	Rosado
13	10	3	40	si	Diluyente	98.2	Amorfo	1	46	-8.30	3.00	Blanco
14	15	3	40	si	Entre 1 y 2	98	Cristalino	2	48	-9.45	2.80	Amarillo
15	10	5	40	si	Std 1	98.9	Amorfo	1	47	-8.10	4.85	Amarillo
16	15	5	40	si	Std 2	97	Cristalino	2	55	-9.50	4.75	Amarillo
17	12.5	4	35	si	Std 1	98.1	Cristalino	1	47	-11.10	4.20	Amarillo
18	12.5	4	35	si	Std 1	98.7	Cristalino	1	46	-10.92	4.15	Amarillo
19	12.5	4	35	si	Std 1	98.5	Cristalino	1	48	-11.05	4.30	Amarillo
20	12.5	4	35	si	Std 2	98	Cristalino	1	49	-11.10	4.10	Amarillo

Tabla 3. Resumen global de resultados obtenidos para cada una de las características evaluadas en las muestras liofilizadas de conformidad al diseño experimental.

* *Intenso*

Experimento	Absorbancia a 200 nm	Temperatura de fusión con descomposición (DSC)	Absorbancia a 280 nm	Intensidad de las bandas a 3250 en Infrarrojo cm^{-1}	Intensidad de las bandas a 550 en Infrarrojo cm^{-1}	Humedad (%)
1	0.4628	54.32	264	3282.71	444.28	2.0
2	0.7906	64.12	242	3279.02	492.50	2.4
3	0.5415	64.12	240	3385.84	469.72	2.6
4	0.9481	49.34	238	3284.05	466.05	2.8
5	0.9148	54.32	263	3304.58	583.57	1.8
6	0.5515	64.12	241	3280.47	454.07	1.9
7	0.5409	64.12	243	3276.75	442.92	2.0
8	0.5669	57.64	237	3233.33	522.45	1.7
9	0.5357	51.51	265	3283.09	519.17	2.1
10	0.5282	56.73	242	3283.96	518.37	2.3
11	0.5254	58.28	241	3286.17	520.03	2.7
12	0.5460	62.75	243	3284.42	457.01	2.6
13	0.6147	57.79	263	3285.96	518.05	2.0
14	0.5269	58.28	237	3279.11	534.12	2.3
15	0.5251	58.28	242	3292.38	519.92	1.8
16	0.5311	56.73	236	3305.54	492.24	1.9
17	0.6604	56.73	241	3280.15	495.32	2.1
18	0.5352	56.73	242	3281.06	491.54	1.9
19	0.5239	56.73	243	3296.19	517.71	2.0
20	0.6083	56.73	242	3293.49	543.09	2.2

Tabla 3. Resumen global de resultados obtenidos para cada una de las características evaluadas en las muestras liofilizadas de conformidad al diseño experimental. (Continuación)

2. Resultados Estadísticos.

a) Análisis estadístico de efecto de los factores sobre la opalinidad.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A: Congelamiento	1.5625	1	1.5625	6.86	0.0279
B: Sublimación	2.25	1	2.25	9.88	0.0119
C:Secado Secundario	0.25	1	0.25	1.10	0.3221
D:Soporte	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AB	0.25	1	0.25	1.10	0.3221
AC	0.25	1	0.25	1.10	0.3221
AD	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BC	0.5625	1	0.5625	2.47	0.1505
BD	0.0625	1	0.0625	0.27	0.6131
CD	0.0625	1	0.0625	0.27	0.6131
Total error	2.05	9	0.227778		

$$R^2 = 71.9178 \%$$

Tabla 4. Anova para el efecto de los factores sobre la opalinidad.

La tabla de Anova separa la variabilidad en la opalinidad dentro de cada uno de los efectos. En esta, se prueba el grado de significancia estadística para cada efecto comparando el cuadrado medio y un estimado del error experimental; los valores de probabilidad menores de 0.05 indican que tienen una significancia diferente de cero con un nivel de confianza del 95 %.

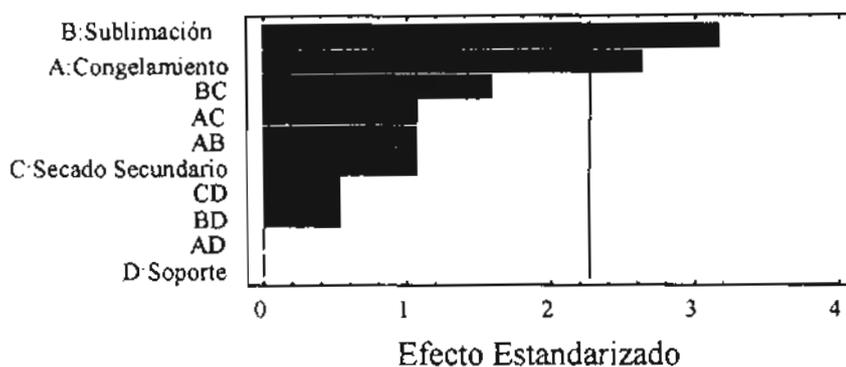
En este caso la tasa de congelación y la tasa de sublimación (*indicadas en negritas*) tienen efecto significativo sobre la opalinidad porque poseen un valor menor de 0.05 (0.0279 y 0.0119 respectivamente), con un nivel de confianza del 95%.

La R^2 calculada indica que el modelo ajustado explica un 71.9178% de la variabilidad en la opalinidad, lo cual es un valor bajo, (considerando valores de 90% o mayores como apropiados).

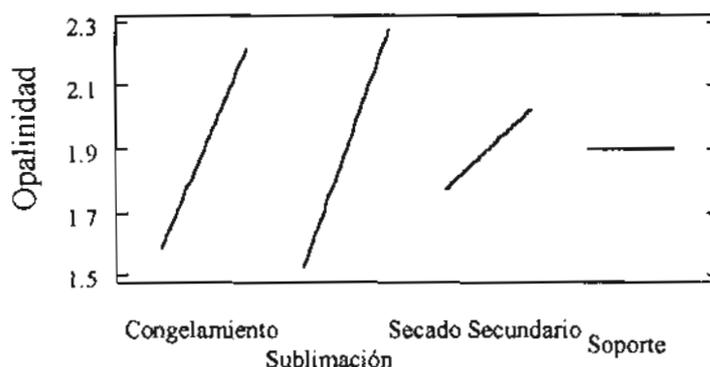
El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\text{Opalinidad} = 1.9 + 0.3125 * \text{congelamiento} + 0.375 * \text{Sublimación} + 0.125 * \text{Secado Secundario} + - 0.125 * \text{congelamiento} * \text{Sublimación} + 0.125 * \text{congelamiento} * \text{Secado Secundario} + 0.1875 * \text{Sublimación} * \text{Secado Secundario} + 0.0625 * \text{Sublimación} * \text{Soporte} - 0.0625 * \text{Secado Secundario} * \text{Soporte}$$

Se debe considerar que para la generación y ajuste del mejor modelo se utilizan todos los factores y sus respectivas interacciones, sin embargo únicamente la congelación y la sublimación presentan un efecto estadísticamente significativo sobre la opalinidad. Esto se puede confirmar con la gráfica de pareto (*gráfica 1*) donde se muestra en orden descendente de importancia el impacto que tienen los factores y sus combinaciones sobre la variable de respuesta. Ambos factores (la congelación y la sublimación) están por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre la opalescencia.



Gráfica 1. Pareto para el efecto de los factores sobre la opalinidad.



Gráfica 2. Valor de la media del efecto de los factores sobre la opalinidad.

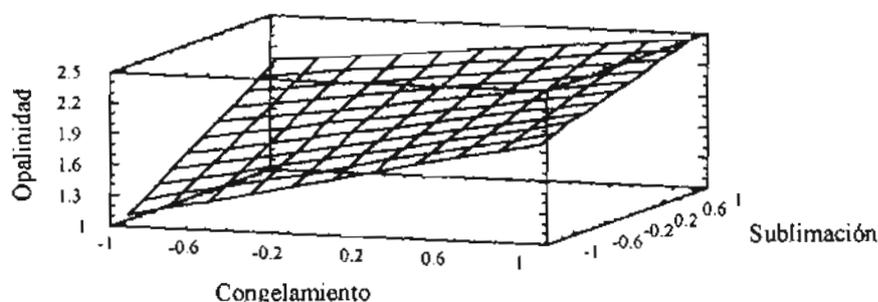
La grafica de los valores medios (*gráfica 2*) de los efectos, muestra el cambio que tiene la variable dependiente como respuesta al cambio de nivel del factor (variable independiente), y entre mayor sea esta pendiente mayor impacto presentara sobre dicha variable dependiente. Para este caso el efecto que presenta la presencia de soporte sobre la opalinidad es nulo, así como el impacto que presenta el secado secundario; sin embargo al cambiar del nivel bajo al nivel alto en el congelamiento y sublimación, el impacto en la pendiente es importante.

Factor	Menor	Mayor	Optimo
Congelamiento	-1.0	1.0	-1.0
Sublimación	-1.0	1.0	-1.0
Secado Secundario	-1.0	1.0	-1.0
Soporte	-1.0	1.0	-1.0

Tabla 5. Nivel optimo (codificado) para el efecto de los factores sobre la opalinidad.

En la tabla de optimización (*tabla 5*) se muestran las condiciones de los factores (de forma codificada) bajo las cuales se conseguirá la mejor respuesta de opalinidad

(considerándose que esta deberá de ser la mínima posible), esto es, la tasa de congelamiento de 10°C/hora, la tasa de sublimación de 3°C/hora, el secado secundario a 30°C y la ausencia de soporte. Lo anterior se corrobora en la gráfica de superficie de respuesta (*gráfica 3*) donde se observa que a medida que se disminuye la tasa de congelamiento y la tasa de sublimación se disminuye el valor de la opalinidad.



Gráfica 3. Superficie de respuesta para el efecto de los factores sobre la opalinidad.

b) Análisis estadístico de efecto de los factores sobre la valoración.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A: Congelamiento	4.30563	1	4.30563	17.97	0.0022
B: Sublimación	0.105625	1	0.105625	0.44	0.5234
C: Sec Sec	0.030625	1	0.030625	0.13	0.7290
D: Soporte	0.105625	1	0.105625	0.44	0.5234
AB	1.38062	1	1.38062	5.76	0.0399
AC	0.455625	1	0.455625	1.90	0.2012
AD	0.030625	1	0.030625	0.13	0.7290
BC	0.000625	1	0.000625	0.00	0.9604
BD	0.005625	1	0.005625	0.02	0.8816
CD	1.05063	1	1.05063	4.38	0.0658
Total error	2.15675	9	0.239639		

$R^2 = 77.5992 \%$

Tabla 6. Anova para el efecto de los factores sobre la valoración.

En la tabla de Anova se prueba el grado de significancia estadística para cada efecto comparando el cuadrado medio y un estimado del error experimental; los valores de probabilidad menores de 0.05 indican que tienen una significancia diferente de cero con un nivel de confianza del 95 %.

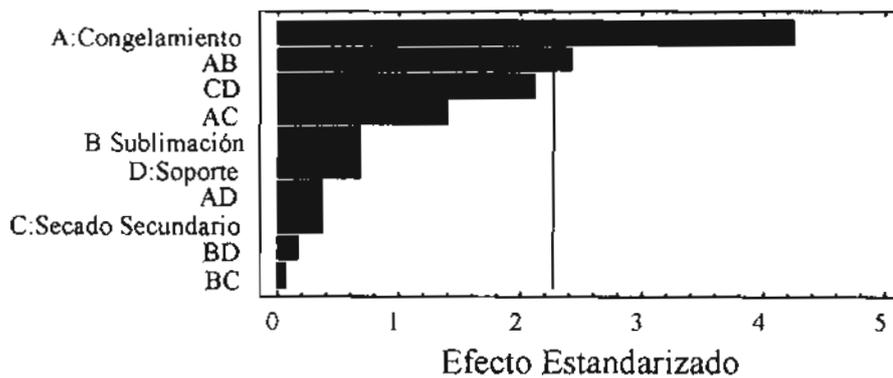
En este caso, (*tabla 6*) la tasa de congelación y la interacción congelación-sublimación (*indicadas en negritas*) son los factores que tienen efecto significativo sobre la valoración porque poseen un valor menor de 0.05 (*0.0022* y *0.0399*), con un nivel de confianza del 95%.

La R^2 calculada indica que el modelo ajustado explica un 77.5992% de la variabilidad en la valoración, lo cual es un valor bajo, (considerando mayores de 90% o mayores como apropiados).

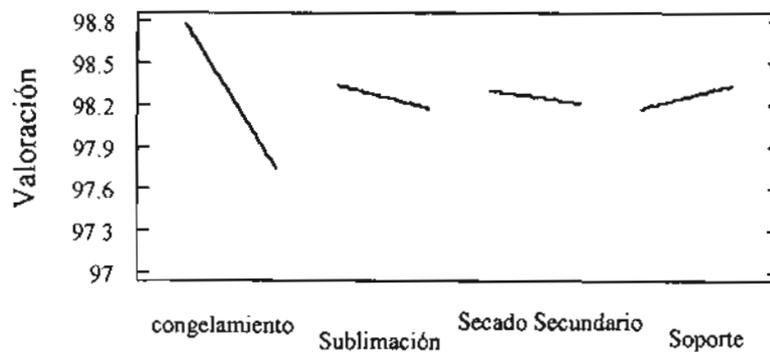
El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\text{Valoración} = 98.26 - 0.51875 * \text{congelamiento} - 0.08125 * \text{Sublimación} - 0.04375 * \text{Secado Secundario} + 0.00125 * \text{Soporte} - 0.29375 * \text{Congelamiento} * \text{Sublimación} + 0.16875 * \text{Congelamiento} * \text{Secado Secundario} + 0.04375 * \text{Congelamiento} * \text{Soporte} + 0.00625 * \text{Sublimación} * \text{Secado Secundario} - 0.01875 * \text{Sublimación} * \text{Soporte} - 0.25625 * \text{Secado Secundario} * \text{Soporte}.$$

Se debe tomar en cuenta que para la generación y ajuste del mejor modelo se utilizan todos los factores y sus respectivas interacciones, sin embargo únicamente la congelación y la interacción congelación-sublimación presentan un efecto estadísticamente significativo sobre la valoración. Por otra parte, según la grafica de pareto (gráfica 4), donde se muestra en orden descendente de importancia el impacto que tienen los factores y sus combinaciones sobre la variable de respuesta, la congelación no es el único factor que está por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre la valoración, también lo está la interacción AB (congelamiento-sublimación), por lo que se confirma lo estimado en el análisis de varianza.

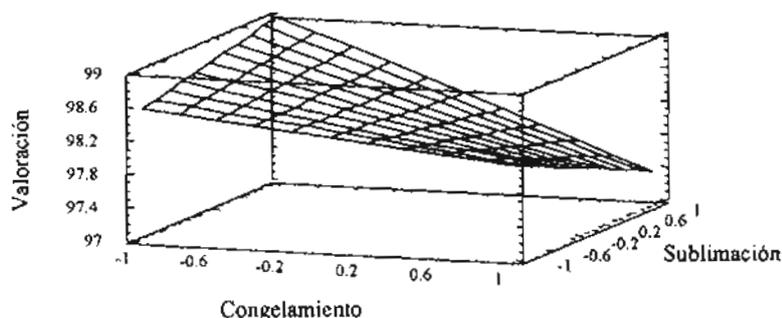


Gráfica 4. Pareto para el efecto de los factores sobre la valoración.



Gráfica 5. Valor de la media del efecto de los factores sobre la valoración.

La gráfica de los valores medios de los efectos (*gráfica 5*) muestran el cambio que tiene la variable dependiente como respuesta al cambio de nivel del factor (variable independiente), y entre mayor sea esta pendiente mayor impacto presentara sobre dicha variable dependiente. Para este caso el efecto que presenta la sublimación, el secado secundario y la presencia de soporte sobre la valoración, es pequeño; pero, por otro lado, el impacto que presenta la congelación, al cambiar del nivel bajo al nivel alto es bastante notorio (*gráfica 6*).



Gráfica 6. Superficie de respuesta para el efecto de los factores sobre la opalinidad.

Factor	Low	High	Optimum
congelamiento	-1.0	1.0	-1.0
Sublimación	-1.0	1.0	1.0
Secado Secundario	-1.0	1.0	-1.0
Soporte	-1.0	1.0	1.0

Optimum value = 99.4725

Tabla 7 . Nivel optimo (codificado) para el efecto de los factores sobre la valoración.

En la tabla de optimización (*tabla 7*) se muestran las condiciones de los factores (de forma codificada) bajo las cuales se conseguirá la mejor respuesta de valoración (considerándose que ésta deberá de ser el valor máximo posible) esto se consigue con una tasa de congelamiento de 10°C/hora, una tasa de sublimación de 5°C/hora, un secado secundario de 30°C y la presencia de soporte (100 mg de lactosa). Esto se corrobora con la gráfica de superficie de respuesta (*gráfica 6*), donde se observa que a medida que se disminuye la tasa de congelamiento se aumenta el valor de la valoración.

c) Análisis estadístico de efecto de los factores sobre la cristalinidad.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A: Congelamiento	2.25	1	2.25	13.97	0.0046
B: Sublimación	0.25	1	0.25	1.55	0.2443
C: Sec Sec	0.25	1	0.25	1.55	0.2443
D: Soporte	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AC	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AD	0.25	1	0.25	1.55	0.2443
BC	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BD	0.25	1	0.25	1.55	0.2443
CD	0.25	1	0.25	1.55	0.2443
Total error	1.45	9	0.161111		

$R^2 = 70.7071 \%$

Tabla 8. Anova para el efecto de los factores sobre la cristalinidad.

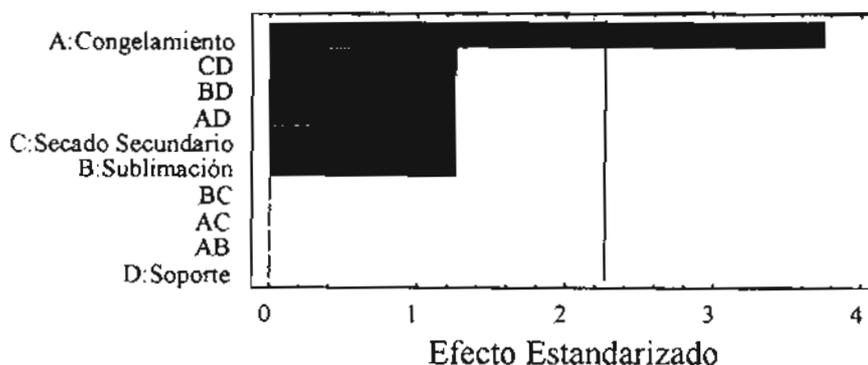
En este caso la tasa de congelación (*indicada en negritas*) es el único factor que tiene efecto significativo sobre la cristalinidad porque posee un valor menor de 0.05 (0.0046) con un nivel de confianza del 95%.

La R^2 calculada indica que el modelo ajustado explica un 70.7079% de la variabilidad en la cristalinidad, lo cual es un valor bajo, (considerando valores de 90% o mayores como apropiados).

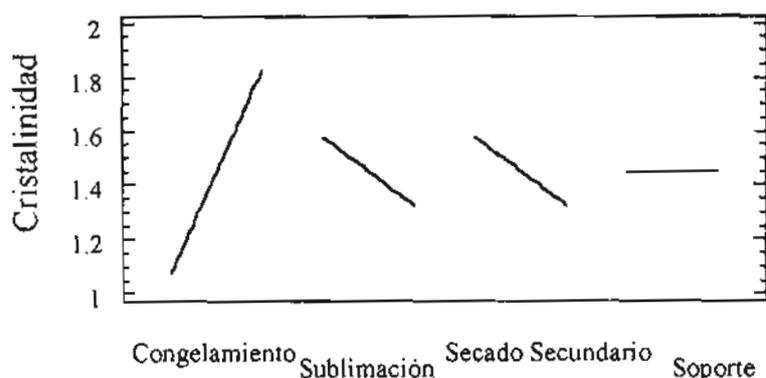
El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\text{Cristalinidad} = 1.45 + 0.375 * \text{Congelamiento} - 0.125 * \text{Sublimación} - 0.125 * \text{Secado Secundario} - 0.125 * \text{Congelamiento} * \text{Soporte} - 0.125 * \text{Sublimación} * \text{Soporte} - 0.125 * \text{Secado Secundario} * \text{Soporte}.$$

Nuevamente se debe considerar que para la generación y ajuste del mejor modelo se utilizan todos los factores y sus respectivas interacciones, sin embargo únicamente la congelación presenta un efecto estadísticamente significativo sobre la cristalinidad. Esto se puede confirmar con la gráfica de pareto (*gráfica 7*) donde la congelación está por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre la cristalinidad.

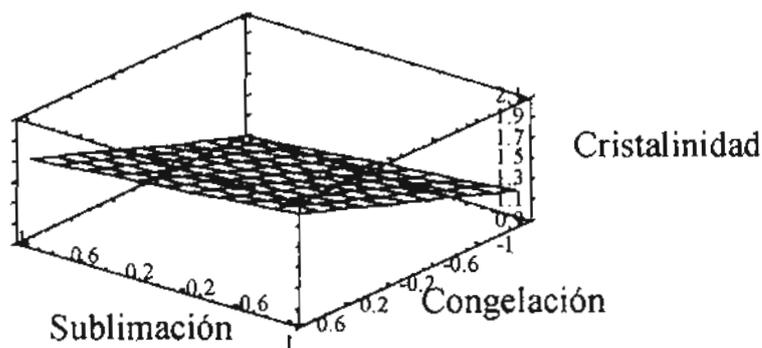


Gráfica 7. Pareto para el efecto de los factores sobre la cristalinidad.



Gráfica 8. Valor de la media del efecto de los factores sobre la cristalinidad.

La gráfica de los valores medios de los efecto muestran, para éste caso (*gráfica 8*), que el efecto que presenta la congelación sobre la cristalinidad es el más importante cuando se cambia del nivel bajo al nivel alto, y que las pendientes generadas con el cambio de nivel no presentan efecto significativo sobre la variable de respuesta.



Gráfica 9. Superficie de respuesta para el efecto de los factores sobre la cristalinidad.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
congelamiento	-1.0	1.0	-1.0
Sublimación	-1.0	1.0	1.0
Sec Sec	-1.0	1.0	1.0
Soporte	-1.0	1.0	1.0

Tabla 9. Nivel óptimo (codificado) para el efecto de los factores sobre la cristalinidad.

En la tabla de optimización (*tabla 9*) se muestran las condiciones de los factores (de forma codificada) bajo las cuales se conseguirá la mejor respuesta de cristalinidad, considerándose que deberá de ser la menor posible (cristalino), esto es, la tasa de

congelamiento de 10°C/hora, la tasa de sublimación de 5°C/hora, el secado secundario a 40°C y la presencia de soporte. Esto se corrobora en la grafica de superficie de respuesta (*gráfica 9*) donde se observa que a medida que se disminuye la tasa de congelamiento y la tasa de sublimación se disminuye el valor de la cristalinidad, lo deseable es que el liofilizado solo tenga el valor de 1.

d) Análisis estadístico del efecto de los factores sobre el Número de Capas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A: Congelamiento	2.25	1	2.25	28.93	0.0004
B: Sublimación	0.25	1	0.25	3.21	0.1066
C: Sec Sec	0.25	1	0.25	3.21	0.1066
D: Soporte	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AB	0.25	1	0.25	3.21	0.1066
AC	0.25	1	0.25	3.21	0.1066
AD	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BC	0.25	1	0.25	3.21	0.1066
BD	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
CD	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Total error	0.7	9	0.08		

$$R^2 = 83.3333 \%$$

Tabla 10. Anova para el efecto de los factores sobre el número de capas.

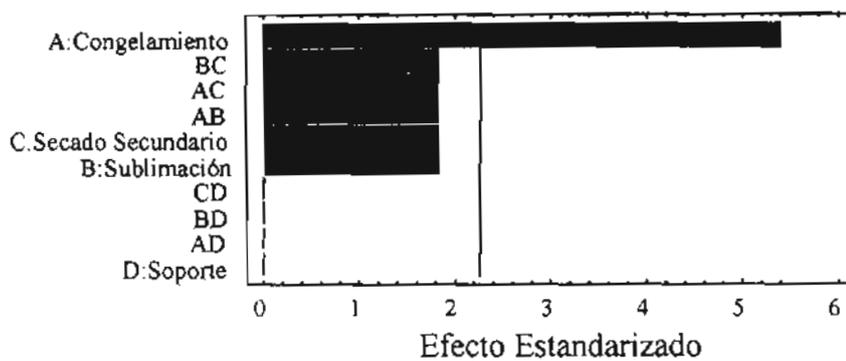
En este caso la tasa de congelación (*indicada en negritas*) es el único factor que presenta efecto significativo sobre la opalinidad porque poseen un valor menor de 0.05 (0.0004), con un nivel de confianza del 95%.

La R^2 calculada indica que el modelo ajustado explica un 83.33% de la variabilidad en el número de capas, lo cual continua siendo un valor bajo (considerando valores de 90% o mayores como apropiados), pero mejor que todos los anteriores.

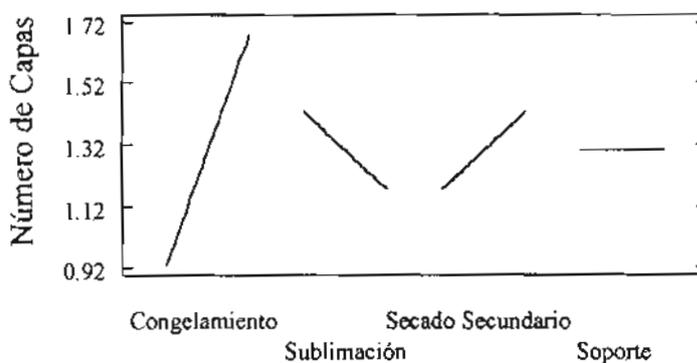
El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\text{Número de Capas} = 1.3 + 0.375 * \text{congelamiento} - 0.125 * \text{Sublimación} + 0.125 * \text{Secado Secundario} - 0.125 * \text{congelamiento} * \text{Sublimación} + 0.125 * \text{congelamiento} * \text{Secado Secundario} + 0.125 * \text{Sublimación} * \text{Secado Secundario}.$$

Se debe considerar que para la generación y ajuste del mejor modelo se utilizan todos los factores y sus respectivas interacciones, sin embargo únicamente la congelación presenta un efecto estadísticamente significativo sobre el número de capas. Esto se puede confirmar con la gráfica de pareto (*gráfica 10*) donde se muestra en orden descendente de importancia el impacto que tienen los factores y sus combinaciones sobre la variable de respuesta. Aquí la congelación es la única barra que está por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre el número de capas.

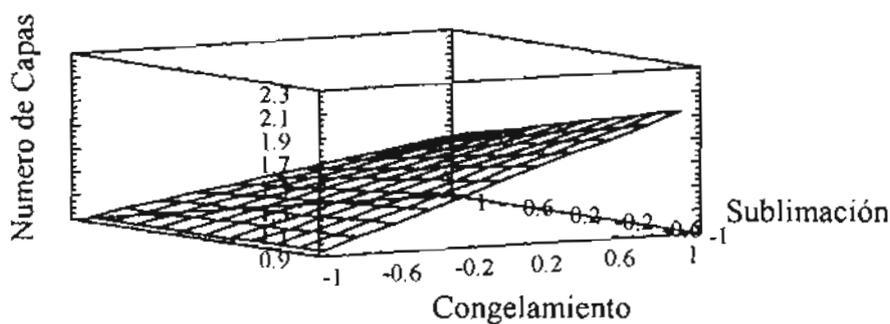


Gráfica 10. Pareto para el efecto de los factores sobre el número de capas.



Gráfica 11. Valor de la media del efecto de los factores sobre el número de capas.

Para este caso la grafica de los valores medios de los efectos (*gráfica 11,*) muestra que el congelamiento presenta un impacto importante al cambiar del nivel bajo al nivel alto en el número de capas, no así los demás factores.



Gráfica 12. Superficie de respuesta para el efecto de los factores sobre el número de capas.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Congelamiento	-1.0	1.0	-1.0
Sublimación	-1.0	1.0	1.0
Secado Secundario	-1.0	1.0	-1.0
Soporte	-1.0	1.0	-1.0

Tabla 11. Nivel óptimo (codificado) para el efecto de los factores sobre el número de capas.

En la tabla de optimización (tabla 11), se muestran las condiciones de los factores (de forma codificada) bajo las cuales se conseguirá la mejor respuesta en el número de capas, considerándose que deberá de ser la menor posible (es decir una), esto es, la tasa de congelamiento de 10°C/hora, la tasa de sublimación de 5°C/hora, el secado secundario a 30°C y la ausencia de soporte. Esto se corrobora en la gráfica de superficie de respuesta (gráfica 12) donde se observa que a medida que se disminuye la tasa de congelamiento se disminuye el valor de número de capas.

e) Análisis estadístico del efecto de los factores sobre el tiempo de reconstitución.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A: Congelamiento	25.0	1	25.0	5.46	0.0442
B: Sublimación	25.0	1	25.0	5.46	0.0442
C: Sec Sec	2.25	1	2.25	0.49	0.5010
D: Soporte	4.0	1	4.0	0.87	0.3743
AB	4.0	1	4.0	0.87	0.3743
AC	0.25	1	0.25	0.05	0.8205
AD	4.0	1	4.0	0.87	0.3743
BC	0.25	1	0.25	0.05	0.8205
BD	16.0	1	16.0	3.50	0.0944
CD	2.25	1	2.25	0.49	0.5010
Total error	41.2	9	4.57		

R-squared = 66.8277 %

Tabla 12. Anova para el efecto de los factores sobre el tiempo de reconstitución.

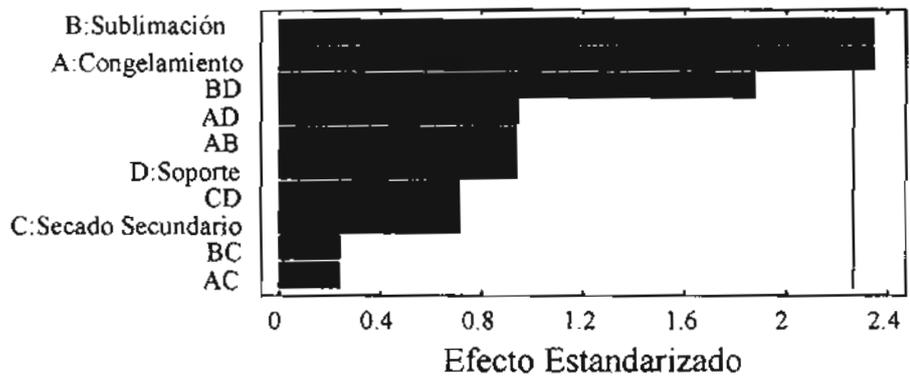
En este caso, la tasa de congelación y la tasa de sublimación (*indicadas en negritas*) tienen efecto significativo sobre el tiempo de reconstitución porque poseen un valor menor de 0.05 (0.0442 y 0.0442 respectivamente), con un nivel de confianza del 95%.

La R² calculada indica que el modelo ajustado explica un 66.8277% de la variabilidad en el tiempo de reconstitución, lo cual es un valor bajo, (considerando valores mayores del 90% o mayores como apropiados).

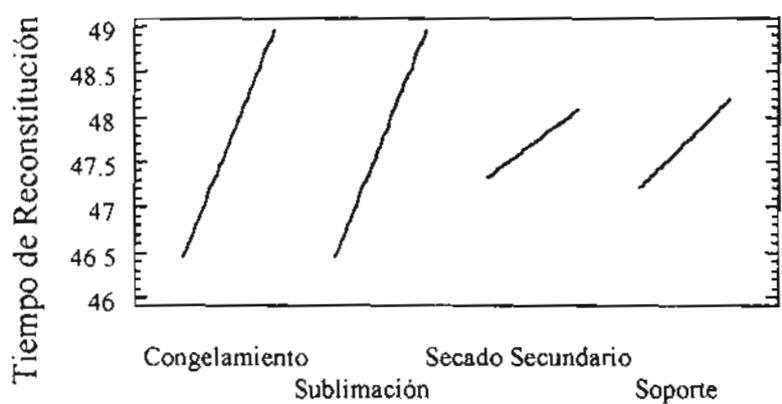
El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

Tiempo de Reconstitución = 47.7 + 1.25 * Congelamiento + 1.25 * Sublimación + 0.375 * Secado Secundario + 0.5 * Soporte - 0.5 * Congelamiento * Sublimación + 0.125 * Congelamiento * Secado Secundario + 0.5 * Congelamiento * Soporte + 0.125 * Sublimación * Secado Secundario + 1.0 * Sublimación * Soporte + 0.375 * Secado Secundario * Soporte.

Al igual que en los casos anteriores se debe considerar que para la generación y ajuste del mejor modelo se utilizan todos los factores y sus respectivas interacciones, sin embargo únicamente la congelación y la sublimación presentan un efecto estadísticamente significativo sobre el tiempo de reconstitución. Esto se puede confirmar con la gráfica de Pareto (*gráfica 13*), donde se muestra en orden descendente de importancia el impacto que tienen la congelación y la sublimación sobre la variable de respuesta. Ambos factores están por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre el tiempo de reconstitución.

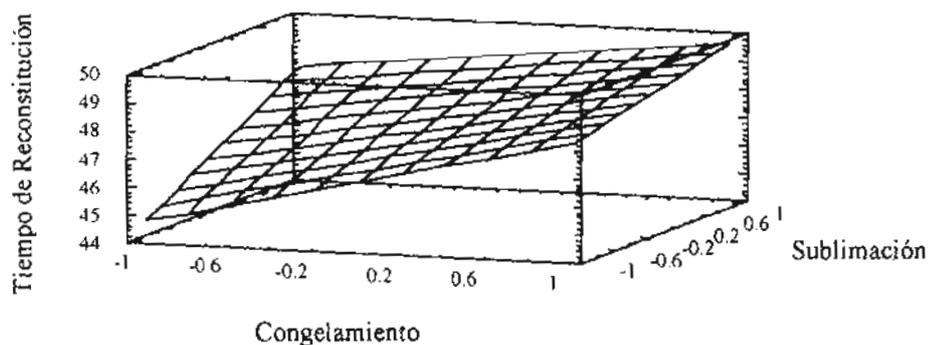


Gráfica 13. Pareto para el efecto de los factores sobre el tiempo de reconstitución.



Gráfica 14. Valor de la media del efecto de los factores sobre el tiempo de reconstitución.

Para este caso, el efecto de los valores medios de los efectos (*gráfica 14*), presenta sobre el tiempo de reconstitución al cambiar del nivel bajo al nivel alto tiene un impacto importante, tanto para la congelación, como para la sublimación.



Gráfica15. Superficie de respuesta para el efecto de los factores sobre el tiempo de reconstitución.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
congelamiento	-1.0	1.0	-1.0
Sublimación	-1.0	1.0	-1.0
Sec Sec	-1.0	1.0	-1.0
Soporte	-1.0	1.0	1.0

Tabla 13. Nivel óptimo (codificado) para el efecto de los factores sobre el Número de Capas.

En la tabla de optimización (tabla 13), se muestran las condiciones de los factores (de forma codificada) bajo las cuales se conseguirá la mejor respuesta de tiempo de reconstitución, considerándose que deberá de ser la menor posible, esto es, la tasa de congelamiento de 10°C/hora, la tasa de sublimación de 3°C/hora, el secado secundario a 30°C y presencia de soporte. Esto se corrobora en la gráfica de superficie de respuesta (gráfica 15), donde se observa que a medida que se disminuye la tasa de congelamiento y la tasa de sublimación se disminuye el valor del tiempo de reconstitución; esto es lo más apropiado para un liofilizado que se desea reconstituir para poder ser administrado.

f) Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la absorbancia a 280 nm.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A: Congelamiento	689.063	1	689.063	90.37	0.0000
B: Sublimación	588.063	1	588.063	77.12	0.0000
C: Secado Secundario	10.5625	1	10.5625	1.39	0.2694
D: Soporte	0.0625	1	0.0625	0.01	0.9298
AB	410.063	1	410.063	53.78	0.0000
AC	14.0625	1	14.0625	1.84	0.2075
AD	0.0625	1	0.0625	0.01	0.9298
BC	1.5625	1	1.5625	0.20	0.6615
BD	3.0625	1	3.0625	0.40	0.5420
CD	10.5625	1	10.5625	1.39	0.2694
Total error	68.625	9	7.625		
Total (corr.)	1795.75	19			

$R^2 = 96.1785 \%$

Tabla 14. Anova para el efecto de los factores sobre absorbancia a 280 nm.

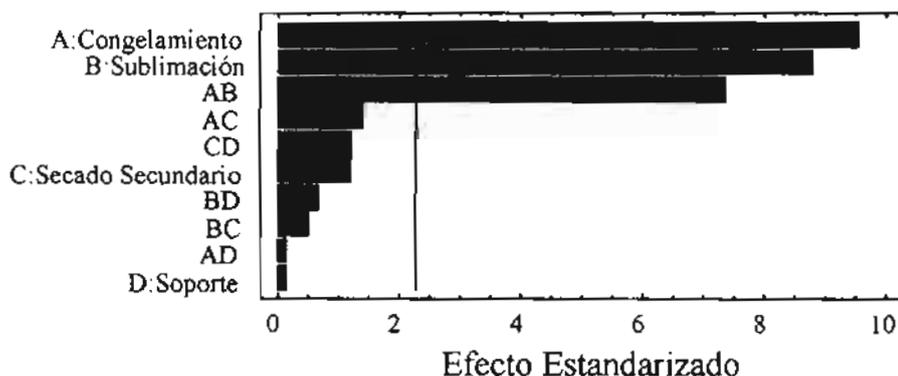
En este caso, la tasa de congelación, la tasa de sublimación y su interacción (*indicadas en negritas*) tienen efecto significativo sobre la absorbancia a 280 nm porque poseen un valor menor de 0.05 (0.000, 0.000 y 0.000 respectivamente), con un nivel de confianza del 95%.

La R^2 calculada indica que el modelo ajustado explica un 96.1885% de la variabilidad en la opalinidad, lo cual es un valor apropiado, (considerando valores de 90% o mayores como correctos).

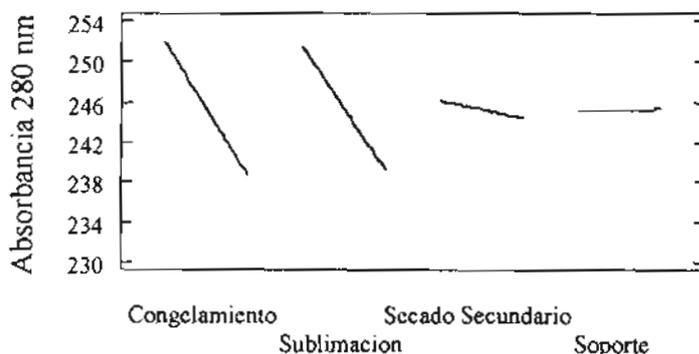
El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\text{Absorbancia}_{280\text{ nm}} = 245.25 - 6.5625 * \text{Congelamiento} - 6.0625 * \text{Sublimación} - 0.8125 * \text{Secado Secundario} + 0.0625 * \text{Soporte} + 5.0625 * \text{Congelamiento} * \text{Sublimación} - 0.9375 * \text{Congelamiento} * \text{Secado Secundario} - 0.0625 * \text{Congelamiento} * \text{Soporte} + 0.3125 * \text{Sublimación} * \text{Secado Secundario} + 0.4375 * \text{Sublimación} * \text{Soporte} - 0.8125 * \text{Secado Secundario} * \text{Soporte}$$

En la gráfica de Pareto (*gráfica 16*) se muestra en orden descendente de importancia el impacto que tienen los factores y sus combinaciones sobre la variable de respuesta. Ambos factores (la congelación, la sublimación y su interacción) están por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre la absorbancia a 280 nm.

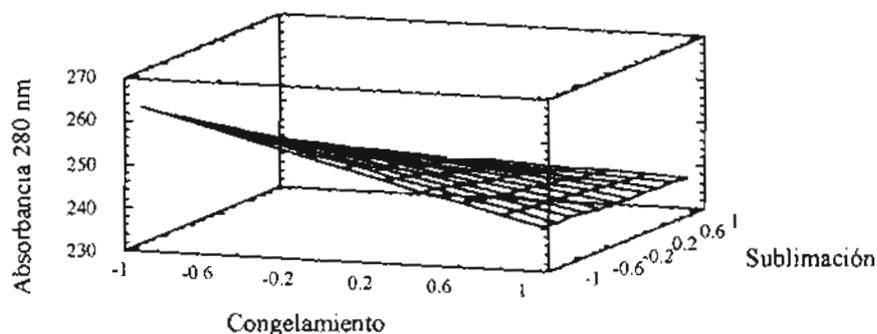


Gráfica 16. Pareto para el efecto de los factores sobre la absorbancia a 280 nm.



Gráfica 17. Valor de la media del efecto de los factores sobre la absorbancia a 280 nm.

La gráfica de los valores medios de los efectos (*gráfica 17*), muestra el cambio que tiene la variable dependiente como respuesta al cambio de nivel del factor (variable independiente), y entre mayor sea esta pendiente mayor impacto presentará sobre dicha variable dependiente. Para este caso el efecto que se presenta al cambiar del nivel bajo al nivel alto en el congelamiento y sublimación sobre la absorbancia es importante, porque se observa un incremento del mismo.



Gráfica 18. Superficie de respuesta para el efecto de los factores sobre la absorbancia a 280 nm.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Congelamiento	-1.0	1.0	-1.0
Sublimación	-1.0	1.0	-1.0
Secado Secundario	-1.0	1.0	1.0
Soporte	-1.0	1.0	-1.0

Tabla 15. Nivel óptimo (codificado) para el efecto de los factores sobre la absorbancia a 280 nm.

En la tabla de optimización (*tabla 15*), se muestra las condiciones de los factores (de forma codificada) bajo las cuales se conseguirá la mejor respuesta de absorbancia, considerándose que deberá de ser la mayor posible, ya que esto se puede asociar con el hecho de que un valor alto de absorbancia indica mayor concentración y por tanto el liofilizado estará totalmente disuelto. Además esto se puede también comprobar con los datos de opalinidad de la tabla 3, donde las muestras que tuvieron una respuesta semejante al diluyente (1,5,9 y 13), son amorfas y de color blanco. Así, las condiciones donde se obtuvieron valores de 263 a 265 de absorbancia fueron una tasa de congelamiento de 10°C/hora y una tasa de sublimación de 3°C/hora con ausencia de soporte. Esto se corrobora en la gráfica de superficie de respuesta (*gráfica 18*) donde se observa que a medida que se disminuye la tasa de congelamiento y la tasa de sublimación se disminuye el valor de la opalinidad. Esto es importante debido a que el máximo de absorbancia se presenta a 200 nm, pero como los factores no tuvieron efecto significativo sobre la absorbancia a esta longitud de onda no se reportó (*apéndice H*).

g) Análisis estadístico del efecto de los factores sobre la temperatura de fusión en DSC.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	Fo	Valor de P
A:Congelamiento	3.11523	1	3.11523	0.18	0.6849
B:Sublimación	6.4516	1	6.4516	0.36	0.5612
C:Secado Secundario	6.27503	1	6.27503	0.35	0.5665
D:Soporte	8.7616	1	8.7616	0.49	0.4998
AB	119.574	1	119.574	6.75	0.0289
AC	0.3481	1	0.3481	0.02	0.8916
AD	6.73402	1	6.73402	0.38	0.5529
BC	1.86322	1	1.86322	0.11	0.7532
BD	11.3569	1	11.3569	0.64	0.4440
CD	2.70603	1	2.70603	0.15	0.7051
Total error	159.501	9	17.7223		

$$R^2 = 51.1762 \%$$

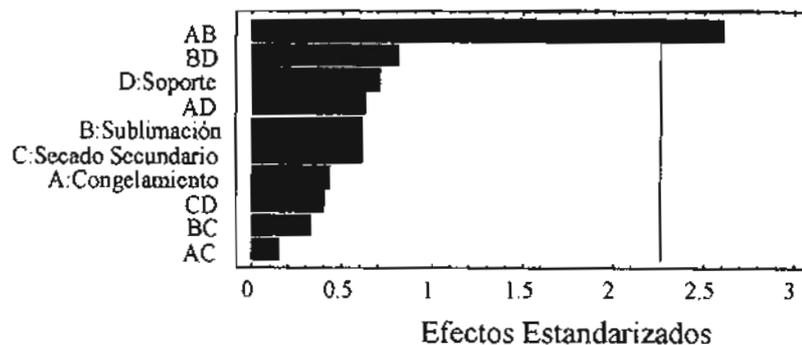
Tabla 17. Anova para el efecto de los factores sobre temperatura de fusión determinada en DSC.

En este caso, la interacción congelamiento-sublimación es el único factor que presentó efecto significativo sobre la temperatura de fusión en DSC, porque poseen un valor menor de 0.05 (0.0289), con un nivel de confianza del 95%.

La R^2 calculada indica que el modelo ajustado explica un 51.1762% de la variabilidad en la temperatura de fusión en DSC, lo cual es el valor mas bajo obtenido.

El modelo obtenido se ajusto a un polinomio de segundo grado de la forma:

$$\begin{aligned} \text{Temperatura de fusión en DSC} = & 56.8555 - 0.0206 * \text{Congelamiento} + 1.0968 * \text{Sublimación} + 0.1643 \\ & * \text{Secado Secundario} + 0.645625 * \text{Soporte} - 1.34812 * \text{Congelamiento} * \text{Sublimación} + 0.314375 \\ & * \text{Congelamiento} * \text{Secado Secundario} + 1.1106 * \text{Congelamiento} * \text{Soporte} - 0.803125 * \\ & \text{Sublimación} * \text{Secado Secundario} + 0.3806 * \text{Sublimación} * \text{Soporte} + 0.0506 * \text{Secado} \\ & \text{Secundario} * \text{Soporte} \end{aligned}$$



Gráfica 20. Pareto para el efecto de los factores sobre la temperatura de fusión en DSC.

En la gráfica de pareto (gráfica 20) se muestra en orden descendente de importancia el impacto que tienen los factores y sus combinaciones sobre la variable de respuestas muestra que la interacción congelamiento-soporte es el única que esta por arriba de la línea que marca efecto significativo sobre temperatura de fusión en DSC. Es

importante notar que las áreas bajo la curva del evento térmico no fueron posibles de cuantificar porque las temperaturas de inicio no fueron lo suficientemente bajas como para poder obtener una línea base y conseguir realizar la integración de forma apropiada, se recomendaría utilizar un equipo con sistema de enfriamiento y comenzar con temperaturas de al menos las obtenidas en la congelación.

VIII. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

El diseño factorial 2^4 con 4 puntos centrales, resulto ser un modelo estadístico adecuado para identificar las variables del proceso de liofilización que afectan las características de calidad del liofilizado de clorhidrato de vancomicina en frasco vial con 500 mg de p.a.

Los factores del proceso de liofilización del clorhidrato de vancomicina que afectan las características de calidad son, las tasas de congelamiento y sublimación, siendo en ambos casos las mejores condiciones las correspondientes a los niveles bajos ($10^{\circ}\text{C}/\text{hora}$ y $3^{\circ}\text{C}/\text{hora}$, respectivamente).

Estas condiciones concuerdan con las consideraciones teóricas, donde se establece que una velocidad de congelamiento lenta, permite que en la matriz del producto se de una separación efectiva del principio activo y del agua como hielo, con lo cual se facilita a su vez, el proceso de sublimación posterior.

Bajo todas las condiciones experimentales estudiadas, la potencia microbiológica del producto no resulto afectada, sin embargo otras características del producto como la cristalinidad, la opalinidad, el color y número de capas del taquete, fueron dependientes del de las variables del proceso de liofilización.

Las variables del proceso de liofilización de la clorhidrato vancomicina que permitieron obtener un producto con las características de calidad esperadas, fueron:

- a) Tasa de congelamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{hora}$
- b) Tasa de sublimación de $3^{\circ}\text{C}/\text{hora}$
- c) Secado secundario a 30°C durante 20 horas
- d) Ausencia de soporte

Será necesario continuar con el estudio del estado sólido de los productos liofilizados de vancomicina clorhidrato obtenidos bajo cada una de las condiciones experimentales del proceso de liofilización, el cual deberá estar soportado en el análisis por difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido a bajas temperaturas (*apéndice E*); con el fin de establecer de manera determinante su estructura física (amorfo o cristal) debido a que el método que se utilizó de birrefringencia no permitió el discernimiento completo de partículas cristalinas y amorfas (*apéndice G*).

IX. BIBLIOGRAFIA

Allison S. Dean, Molina Marion D.C. and Anchordoquy, (2000) "Stabilization of Lipid/DNA Complexes During the Freezing Step of the Lyophilization Process: The Particle Isolation Hypothesis" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1468; 127-138.

Armstrong N.A. and K.C. James, *Pharmaceutical Experimental Design And Interpretation*, Ed. Taylor & Francis, 1996, Great Britain.

Broquaire M. et Raund S., (1995) "Les Applications de la Diffraction des Rayons X AU Controle des Médicaments. Principes Actifs et Formes Galéniques Solides" *S.T.P. Pharma*, 5, (4); 310-316.

Calleja A., Tijero E., Martinez B., Piñol S., Sandiumenge F. and Obradors X., (1999) "Hexaferrite Particles by Coprecipitation and Lyophilization" *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, (196-197); 293-294.

Constantino Henry R., Curley Janet G., Wu Sylvia and Hsu Chung C., (1998) "Water Sorption behavior of lyophilized Protein-Sugar Systems and Implications for Solid-State Interactions" *International Journal of Pharmaceutics*, 166; 211-221.

Dekeyser Philippe M., Corveleyn Sam, Demeester Joseph and Remon Jean-Paul, (1997) "Stabilization of Fully Active Chymopapain by Lyophilization", *International Journal of Pharmaceutics*, 159; 19-25.

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud, 7^{ma}, 1999.

Fernández Fernández Benjamín, (1998) *Liofilización de Productos Farmacéuticos* Ed. Noriega-IPN, México pag. 1-25.

Gatlin L. and Deluca P. P., (1984) "A Study of The Phase Transitions in Frozen Antibiotic Solutions by Differential Scanning Calorimetry", *J. Paren. Sci. and Tech.*, 398-408.

Girón D.,(1996) "Applications of Thermal Análisis in the Pharmaceutical Industry", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 4 (6); 755-770.

Goodman A., Goodman L., *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 7^{ma} Edición, Ed. Panamericana, 1986, México.

Guide to Inspections of Lyophilization of Parenterales, FDA, 1999

Harold Kadin *Analytical Profiles Of Drug Substances*, Edited by Klaus Florey The American Pharmaceutical Assoc., 15; 533-559.

Harris C. Kopecka H., Harris T., (1983) "Vancomycin: Structure and Transformation to CDP-1", *J. Am. Chem. Soc.*, 105; 6915-6922.

Hjelstuen O.K., Saetern A.M. and Tonnesen H.H., (1999) "Development of a Lyophilized Kid Formulation for Labeling of DNA Probes with Tc", *International Journal of Pharmaceutics*, 190; 197-205.

Hung Chin-Chang and Santschi Peter H., (2001) "Spectrophotometric Determination of Total Uronic Acids in Seawater Using Cation-Exchange Separation and Pre-Concentration by Lyophilization", *Analytica Chimica Acta*, 427; 111-117.

Ito Kiji, (1981) "Freeze Drying of Pharmaceuticals, Eutectic Temperature and Collapse Temperature of Solute Matrix upon Freeze Drying of Three Component System", *Chem. Pharm. Bull.*, 18 (8); 1095-1102.

Jeannin C., A. Mangeot y A. Verain, *Ingeniería Farmacéutica*, Ed. El Manual Moderno, 1986, México.

Jennings Thomas A., (1997) "Effect of Formulation on Lyophilization, part 2" *IVD Technology Magazine*, March-April; 42-49.

Lachman Leon, Herbert A. Lieberman and Joseph L. Kanig, *The Theory And Practice Of Industrial Pharmacy*, Third Edition, Ed. Lea & Febiger, 1986, Philadelphia.

Lawson Jhon, José L. Madrigal y John Erjavec, *Estrategias Experimentales Para El Mejoramiento De La Calidad En La Industria*, Ed. Grupo Iberoamérica, 1992, México.

Louis Rey and Joan C., *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, Edited by Marcel Dekker, Inc., 1999, New York.

MICROMEDEX Inc. 1974-2001; *Healthcare Series* 110; Section 7.

Montgomery Douglas C., *Diseño y Análisis De Experimentos*, Ed. Grupo Editorial Iberoamérica, 1991, México.

Muñoz G., Granda D., "Formulación y estudio de estabilidad de clorhidrato de vancomicina, 500 mg, inyectable liofilizado producido en Cuba", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 30, 82), Julio-Septiembre 1999; 15-18.

Nail S. L. and Gatlin L., (1984) "Advances in Control of Production Freeze Drying", *J. of Paren. Sci. and Technology*, 39, (1); 16-27.

Nail S. L., (1980) "The effect Chamber Pressure on Heat Transfer in Freeze Drying of Parenteral Solution", *J. Paren. Sci. and Tech.*, vol. 34 No.5, pp. 115-138.

Patel R.M. and Hurwitz A., (1982) "Eutectic Temperature Determination of Preformulation Systems and Evaluation by Controlled Freeze Drying", *J. Pharm. Sci.*, 61 (11); 1806-1810.

Pearcy Timothy E., (2000) "Lyophilization Processing: FreezeDried microspheres offer new IVD Packaging and Product Opportunities", *IVD Technology Magazine*.

Pgal M.J., Shah S. and Senior D., (1983) "Physical Chemistry of Freeze-Drying: Measurement of Sublimation Rate for Frozen Aqueous Solution", *J. Pharm Sci.*, 76, (2); 635-650.

Pikal M.J., M.R. Leroy and S. Shah, (1984) "Mass and Heat Transfer in Vial Freeze-Drying of Pharmaceuticals: Role of the vial", *A. Pharm. Associ.*, 73, (9); 1224-1237.

Pikal, M.J., (1984) "Use of Laboratory Data in Freez Drying Process Design: Heat and Mass Transfer Coefficients and Computer Simulation of Freeze Drying", *J. Paren. Sci. and Tech.*, March; 115-138.

Pujol Vivian, Sotolongo Jorge, Vega Maribel, Pineda Judith y Costa Lourdes, (1996) "Influencia del uso de Aditivos en la Liofilización del Antígeno de Superficie Recombinante del Virus de la Hepatitis B", *Biotecnología Aplicada*, 13; 12-15.

Pujol Vivian, Sotolongo Jorge, Vega Maribel, Pineda Judith y Costa Lourdes, (1996) "Influencia del uso de Aditivos en la Liofilización del Antígeno de Superficie Recombinante del Virus de la Hepatitis B", *Biotecnología Aplicada*, 13; 12-15.

Rey Louis and Joan C. May, *Freeze-drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, Edited by Marcel Dekker, 1999, New York.

Saez A., Guzmán M., Molpeceres J. and Aberturas M.R., (2000) "Freeze-Drying Polycaprolactone and poly (D, -Lactic-Glicolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral Pharmacokinetics of Loaded Drugs", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50; 379-387.

Sheldrick G. M., Jones P.G., et al., "Structure of Vancomycin and its complex with acetyl-D-alanine" *Nature*, 271 (January 1978); 223-225

Tavaria Freni K., Sousa José M. and Malcata Xavier F., (2001) "Storage and Lyophilization Effects of Extracts of *Cynara Cardunculus* on the Degradation of Ovine and Caprine Caseins", *Food Chemistry*, 72; 79-88.

The Merck Index, 12^a, Merck Co. Inc. USA, 1996.

Valls O. Y B. del Castillo, *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*, 4^a Edición, Ed. Ediciones Piro, 1998, Barcelona.

Wang Wei, (2000) "Lyophilization and Development of Solid Protein Pharmaceuticals" *International Journal of Pharmaceutics*, 203; 1-60.

Williamson M and Williams D., (1981), "Structure revision of antibiotic vancomycin. The use of nuclear overhauser effect difference spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (22); 6580-6915.

Wu Shiaw-Lin, Leung DeMei and Tretyakov Leonid, (2000) "The Formation and Mechanism of Multimerization in a Freeze-Dried Peptide", International Journal of Pharmaceutics; 200, 1-16.

Zimmermann E., Muller R.H., Mader K., (2000) "Influence of Different Parameters on Reconstitution of Lyophilized SLN", International Journal of Pharmaceutics, 196; 211-213.

APENDICE A

Calificación del Equipo de Liofilización

El objetivo de la calificación fue establecer la evidencia documentada de todas las especificaciones críticas resumidas en los Requerimientos Específicos de Uso del Cliente y del vendedor, que se encuentran en el equipo, control de calidad y entrega de documentos.

I. MAPEO DE TEMPERATURA DE LOS ANAQUELES.

Objetivo : Medir la variación de temperatura en diferentes posiciones en un anaquel y entre ellos.

Método : Se llevan a cabo cinco pruebas de temperatura inercial calibradas (tipo Pt100) en los anaqueles.

El mapeo se desarrolla a tres temperaturas diferentes sobre una escala estática.

Prueba 1. Temperatura de entrada de -40°C .

Prueba 2. Temperatura de entrada 0°C .

Prueba 3. Temperatura de entrada $+20^{\circ}\text{C}$.

Las temperaturas fueron registradas con un equipo externo certificado cada diez segundos, durante 20 minutos.

En cada anaquel:

El promedio de la temperatura de las cinco posiciones (S1 a S5) es calculado (en un promedio de 120 valores para cada posición) esto nos conduce a 5 promedios de temperatura por anaquel.

Entre los anaqueles:

Para cada anaquel, es calculado el promedio de las cinco temperaturas (S1 a S5), eso nos lleva a un promedio de temperatura para ese anaquel.

Para dicha información (esto no es un criterio de aceptación) se llena una tabla para comparar la temperatura medida del silicón entrante y el promedio de las cinco temperaturas promedio (S1 a S5).

La identificación y el número certificado de calibración del equipo utilizado se escribe en la siguiente página antes de comenzar la prueba, cuando ésta termina el informe se imprime en la hoja de resultados.

En la celda de la página de resultados se escribe el número anexo de la información de la temperatura.

Criterio de Aceptación: La desviación entre el promedio máximo y mínimo de temperatura debe ser menor o igual a 2°C (en cada anaquel o entre ellos):

1. Cámara de secado y vacío.
2. Puerta cerrada.
3. Válvula de separación cerrada.
4. Válvula de frenado de vacío abierta.
5. Bomba circulatoria encendida.
6. LN2 de enfriamiento encendido.

Resultados de mapeo:

- ❖ Curva de temperatura de las diferentes pruebas por anaquel.
- ❖ La temperatura promedio sobre el periodo medido por prueba en el mismo anaquel.
- ❖ La temperatura máxima y mínima de cada anaquel.

Equipo utilizado:

Almacenador de datos, pruebas de temperatura inercial.

II. MAPEO DE TEMPERATURA DE LOS ANAQUELES, RESULTADO POR ANAQUEL.

Temperaturas Máximas y Mínimas para el mismo Anaquel.

# Anaquel	Temp °C	Pba. de temp. promedio sobre el periodo medido	Temp mín. °C	Temp. máx. °C	Criterio de aceptación T [°C]	Aprobado	Rechazado	# Anexo

2.1 MAPEO DE TEMPERATURA DE LOS ANAQUELES, RESULTADOS ENTRE LOS ANAQUELES.

Máxima Desviación entre la Temperatura de Anaquel.

Temp. °C	-40 °C	0.0	+20.0

III . CICLO DE LA PRUEBA DE DESARROLLO.

Condiciones de Inicio: Las siguientes condiciones se deben completar antes de comenzar el ciclo de la prueba de desarrollo.

1. Cámara vacía, limpia y seca.
2. Puerta cerrada.

El tiempo de enfriamiento se encuentra en los datos almacenados y escritos en la tabla para las temperaturas en cuestión.

V. DESALOJO DE LA CÁMARA .

Objetivo : Medir el tiempo de desalojo de la cámara.

Método : El ciclo automático de la “prueba de desarrollo” en el sistema de control del secador por congelación es utilizado para éste propósito.

Colocar la presión de desalojo de la cámara a 100 μ bar en la imagen de la prueba de desarrollo.

La presión es medida con el indicador de vacío de la cámara registrada automáticamente por el procedimiento de prueba de desarrollo en el sistema de control del secador por congelación .

El resultado se encuentra en el almacenador de datos.

Criterio de Aceptación : La cámara es desalojada de la presión atmosférica a 100 μ bar en 23 (+- 10 %) más o menos .

Resultados:

Punto de Referencia	Criterio de Aceptación	Observaciones	Aprobado	Rechazado / # de Desviación
Tiempo de evacuación de la cámara	Menor o igual a 23 (+-10%) minutos	minutos		

VI. PRUEBA DEL INCREMENTO DE LA PRESION

Objetivo : Medir la compresión del aire del secador en frío .

Método : El ciclo automático de la “prueba de desarrollo” en el sistema de control del secador por congelación es utilizado para este propósito .

Colocar la prueba de duración de fuga a 600 min en la imagen de la prueba de duración .

La presión es medida con el marcador de vacío en la cámara, registrado automáticamente por el procedimiento de prueba de desarrollo en el sistema de control del secador por congelación .

El volumen de la cámara y el condensador ha sido registrado en los documentos del secador por congelación . El tiempo de inicio es registrado cuando la condición de presión estabilizada es alcanzada en la cámara, (para no ser influenciado por criogénicos potenciales ó fenómenos degasificantes, la presión inicial de ensayo se identifica una hora

Parámetros del Software para Ingresar:

Enfriamiento de Anaquel (°C)	-65
Enfriamiento del Condensador	-40
Presión de Vacío (μ bar)	100
Duración de Examen de Presión Elevada (minutos)	600
Temperatura de Calentamiento (°C)	40

NOTA:

Un registro de la información del ciclo (nombre del formato del archivo: PE_XXXdta) es anexado en el apéndice (éste apéndice es identificado, y su referencia es escrita en la celda de la tabla que se encuentra abajo) estos datos son guardados bajo un nombre de archivo y en disco duro o disco flexible.

IV. TIEMPO DE ENFRIAMIENTO DE ANAQUEL.

Objetivo : Medir la velocidad de enfriamiento del aceite de silicón circulando entre los anaqueles.

Método : El ciclo automático de la “prueba de desarrollo” en el sistema de control del secador por congelación es utilizado para este propósito, la prueba se desarrolla en una cámara vacía. Colocar la temperatura de enfriamiento de anaquel a -65°C para que se tenga una velocidad de congelamiento máximo a -40°C y medir la temperatura mínima de anaquel alcanzada.

La prueba comienza cuando la temperatura del aceite de silicón esta por encima o igual a 20°C .

La temperatura del aceite de silicón es registrada e impresa.

El resultado se encuentra en un almacenador de datos de la prueba de desarrollo obtenida por el sistema de control del secador por congelación .

Criterio de Aceptación : La duración a alcanzar es de -40°C partiendo de 20°C : 40 (+-10 %) minutos o menos. Temperatura mínima de -65°C .

Resultados :

Temperatura Inicial	°C
---------------------	----

Temperatura (°C)	Tiempo Transcurrido (min)
-20	
-30	
-40	
-50	

después del aislamiento del volumen a prueba). El tiempo final es registrado después del tiempo total realizado (10 horas). El resultado se encuentra registrado en el almacenador de datos.

Criterio de Aceptación : Incremento de presión, 1×10^{-2} ($\pm 10\%$ $\mu\text{bar L/s}$) o menos, es obtenido cuando se alcanza una condición de presión estable en la cámara.

VII. TIEMPO DE CALENTAMIENTO DEL ANAQUEL

Objetivo : Medir el tiempo de temperatura de calentamiento.

Método: Se utiliza el software de ayuda de la prueba de desarrollo en el sistema de control de secado por congelación para éste propósito.

Para el inicio de la prueba la temperatura de los anaqueles debe ser menor o igual a -40°C .

Colocar la temperatura de calentamiento del anaquel a $+40^{\circ}\text{C}$ en el esquema de la prueba de desarrollo.

La temperatura de entrada del aceite de silicón es registrada e impresa.

Los resultados se encuentran en el almacenador de datos de la prueba de desarrollo colectados por el sistema de control del secado por congelación.

Criterios de Aceptación : La temperatura sube de -40°C a $+20^{\circ}\text{C}$ desarrollada dentro de 60 ($\pm 10\%$) minutos o menos. Esto es equivalente a una velocidad de temperatura de $1^{\circ}\text{C/ minuto}$.

Resultados :

Temperatura Inicial :	°C
Temperatura (° C)	Tiempo transcurrido (min)
-20	
0	
+20	
+40	

VIII. OTRAS PRUEBAS DE CICLO

8.1 CICLO DE SECADO EN FRIO

Objetivo : Verificar que el ciclo de secado por congelación se realice correctamente de acuerdo al plan establecido.

Método : Un plan de prueba (provisto por comprador y en acuerdo con USIFROID) es escrito en la parte del submenú .

El plan se registra y guarda en el correspondiente apéndice.

De cualquier forma USIFROID propone un plan estándar (ver más adelante) .

Los datos del ciclo son almacenados y registrados en número y gráficamente en: nombre del archivo de almacenamiento de datos para el ciclo de secado por congelación: (date).dta); para la obtención de curvas: usar el software Winzoom. El nombre del archivo para las gráficas del ciclo es: (date) syn.

Criterios de Aceptación : El ciclo debe correrse y estar controlado a través de cada uno de los segmentos del ciclo de acuerdo con los parámetros dados en el plan.

Estado: El estado de la máquina para esta prueba es el mismo que se requiere para una corrida normal de ciclo de secado por congelación.

8.2 CICLO DE DESCONGELAMIENTO.

Objetivo: El objetivo de la prueba es revisar que el ciclo de descongelamiento se realice correctamente de acuerdo al plan establecido.

Método: Un ciclo de descongelamiento se realiza después de un ciclo de secado por congelación, en modo automático con parámetros elegidos.

La lista de los parámetros integrados se imprime y encierra en el apéndice.

Se revisa visualmente que las bobinas del condensador estén libres de hielo después del término del ciclo.

Criterio de Aceptación : Las bobinas del condensador deben estar libres de hielo después del término del ciclo.

Condiciones de Inicio : Las condiciones de inicio para esta prueba son iguales a las requeridas al realizar un ciclo de descongelamiento normal.

Resultados:

Punto de Referencia	Criterios de Aceptación	Observaciones	Aprobado	Rechazado / # de Desviación
Control visual del condensador enrollado	No debe ser visible el hielo en el rollo después de terminar el ciclo de descongelam.			

8.3 CICLO DE ESTERILIZACIÓN.

Objetivo : Revisar que el ciclo de esterilización se realice correctamente y que todas las pruebas de temperatura indiquen por lo menos 121°C durante el proceso de esterilización.

Método : Diez pruebas de temperatura se colocan dentro de la cámara. Estas posiciones son acordadas por USIFROIDE y son solamente restringidas por la longitud de los cables de prueba y acceso a las partes de la cámara, condensador y válvula de separación.

El canal de registro y número de prueba deben ser registrados.

La lista de parámetros ingresados es impresa y encerrada en el apéndice.

Llevar a cabo un ciclo de esterilización en modo automático. Duración mínima del ciclo a una temperatura de esterilización es de 20 minutos.

Los registros de cada prueba son tomados cada 30 segundos por la validación del almacenador de datos y son entregados en forma numérica.

La información de ciclo es registrada, impresa en forma gráfica y numérica (nombre del archivo para el almacenador de datos del ciclo de secado en frío: ST_XXXX.dta) para obtener las curvas: utilizar el software Winzoom. Nombre del archivo para las curvas del ciclo de secado por congelación : ST_XXXX.syn) .

Criterio de Aceptación: El ciclo es realizado y controlado a través de cada segmento del ciclo de acuerdo con los parámetros en el plan.

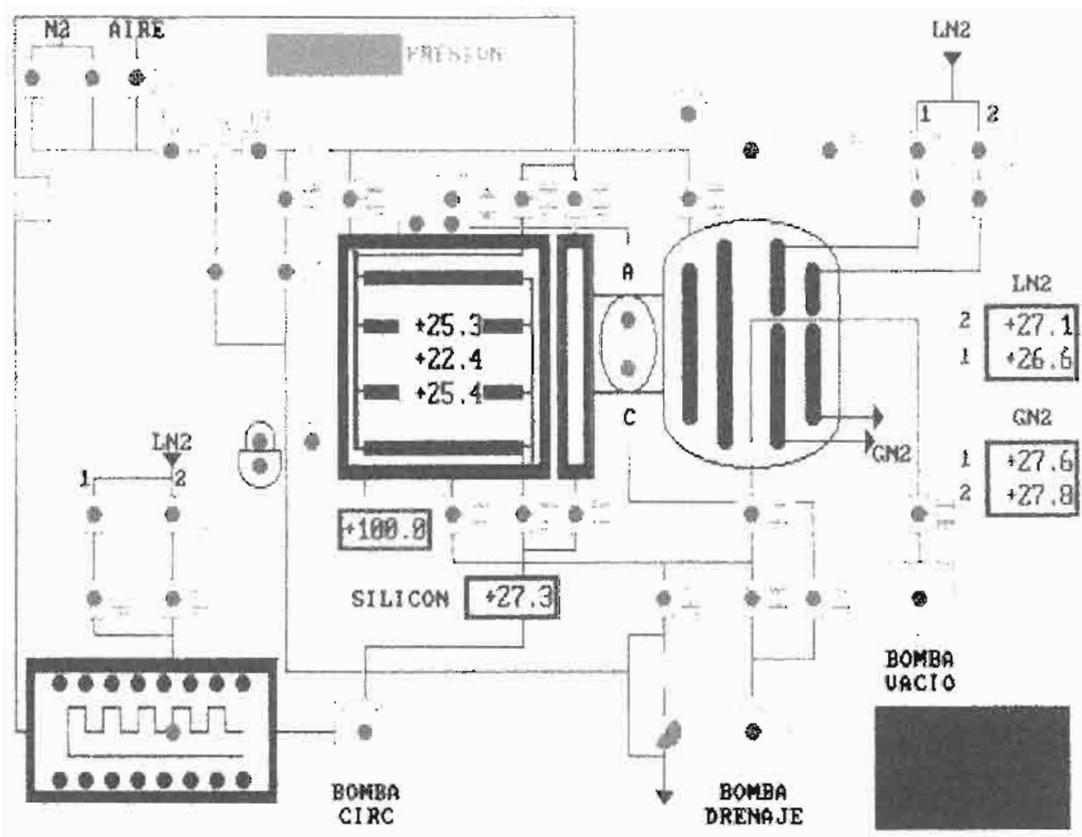
Todas las temperaturas registradas deben ser por encima de la temperatura de esterilización (121°C) por 20 minutos.

La diferencia entre las pruebas de temperatura no deben exceder $\pm 1^{\circ}\text{C}$ de la temperatura promedio.

Las diferencias entre las pruebas de temperatura promedio y la temperatura determinada no deben de exceder $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

APÉNDICE B

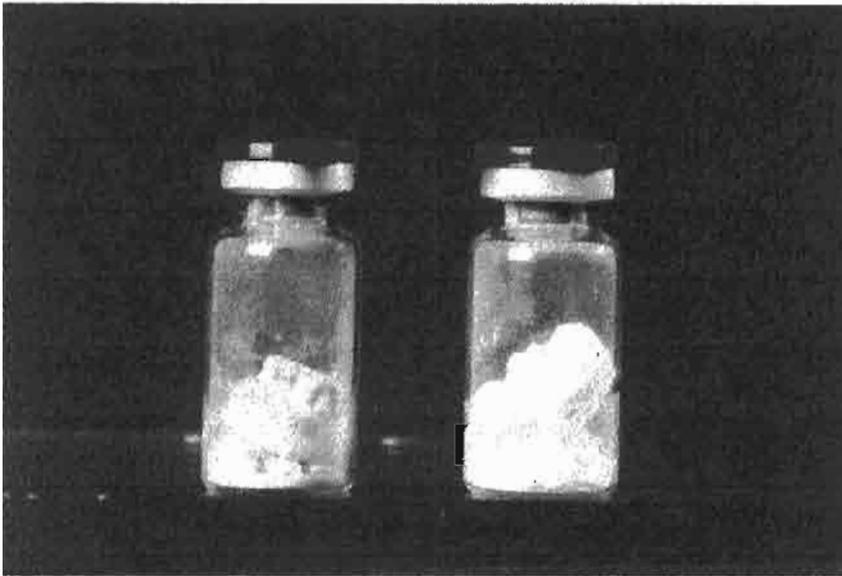
Diagrama de la liofilizadora



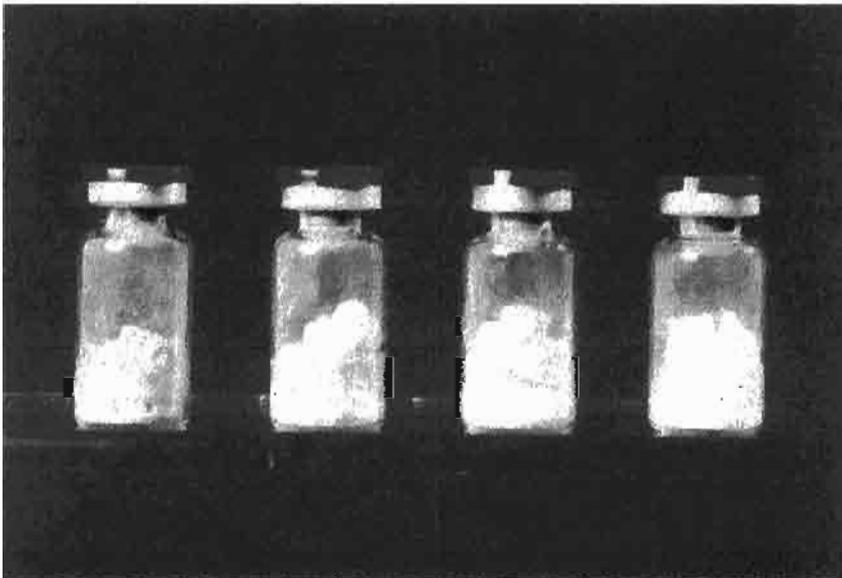
N ₂ :	Entrada de nitrógeno
Aire :	Entrada de aire estéril
Presión:	Presión de la cámara
25.3 :	Temperatura de la placa superior
22.4 :	Temperatura de la placa intermedia
25.4 :	Temperatura de la placa inferior
A:	Válvula de apertura del condensador
B:	Válvula de cerrado del condensador
GN ₂ :	Válvulas de drenaje

APÉNDICE C

APARIENCIA DEL PRODUCTO LIOFILIZADO



Diferencias entre muestra 8 (izquierda) y muestra 1 (derecha)

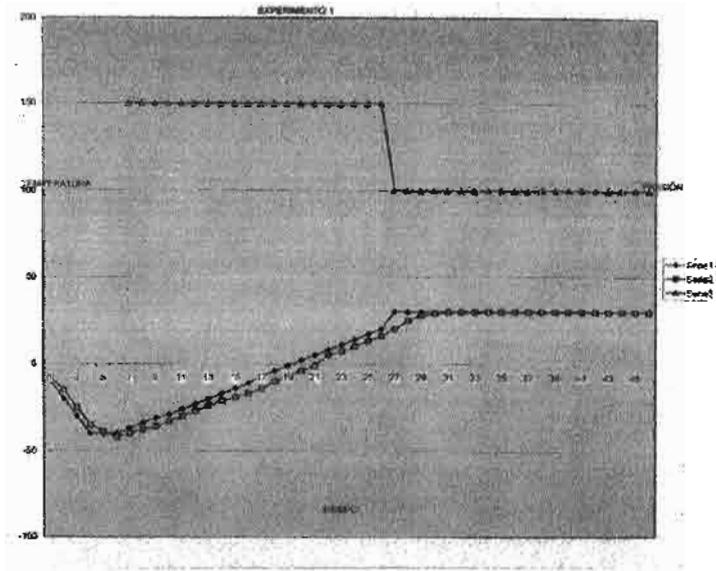


Diferencias de tono en el paquete entre muestras, de izquierda a derecha, muestra 8 (café), muestra 4 (rosada), muestra 2 (amarilla) y muestra 1 (blanca)

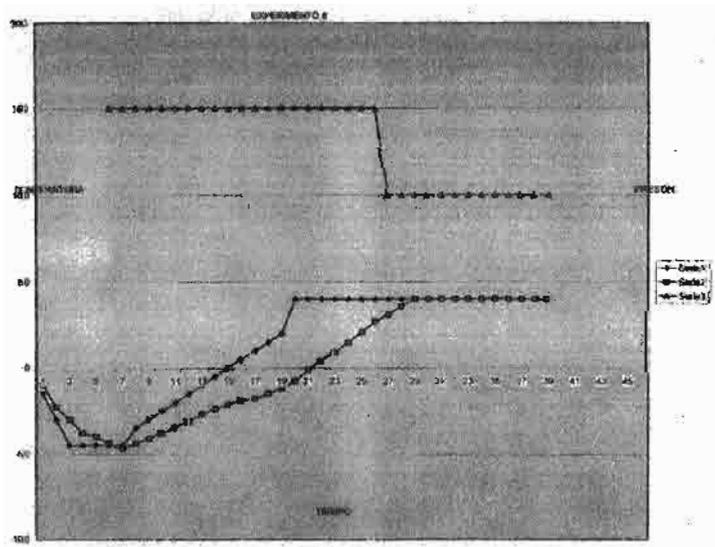
APÉNDICE D

GRÁFICAS DE COMPORTAMIENTO DEL PRODUCTO

En estas gráficas se aprecia el comportamiento de la temperatura del producto relacionado a los cambios en las placas.



Gráfica de comportamiento del producto para el ciclo de liofilización de la muestra 1

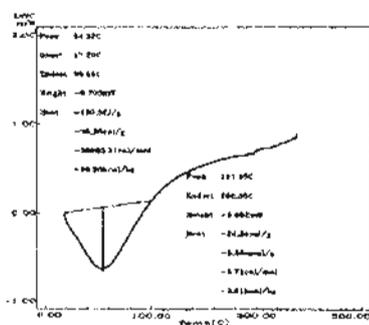


Gráfica de comportamiento del producto para el ciclo de liofilización de la muestra 8

APÉNDICE E

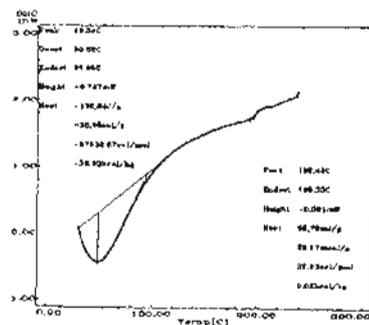
TERMOGRAMAS DE LAS MUESTRAS DETERMINADAS EN DSC

ANÁLISIS TÉRMICO



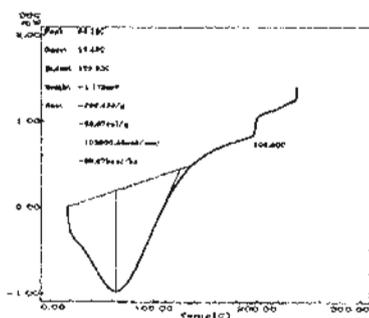
Termograma de la muestra 1

ANÁLISIS TÉRMICO



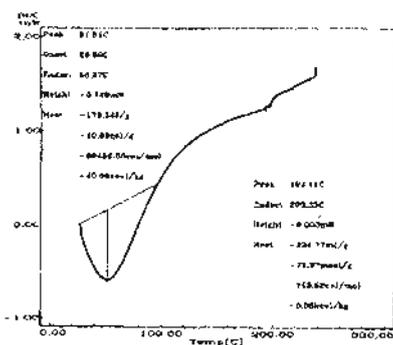
Termograma de la muestra 3

ANÁLISIS TÉRMICO



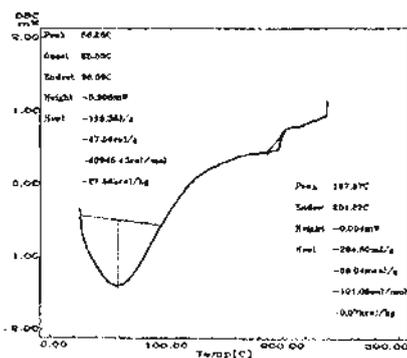
Termograma de la muestra 4

ANALISIS TERMICO



Termograma de la muestra 9

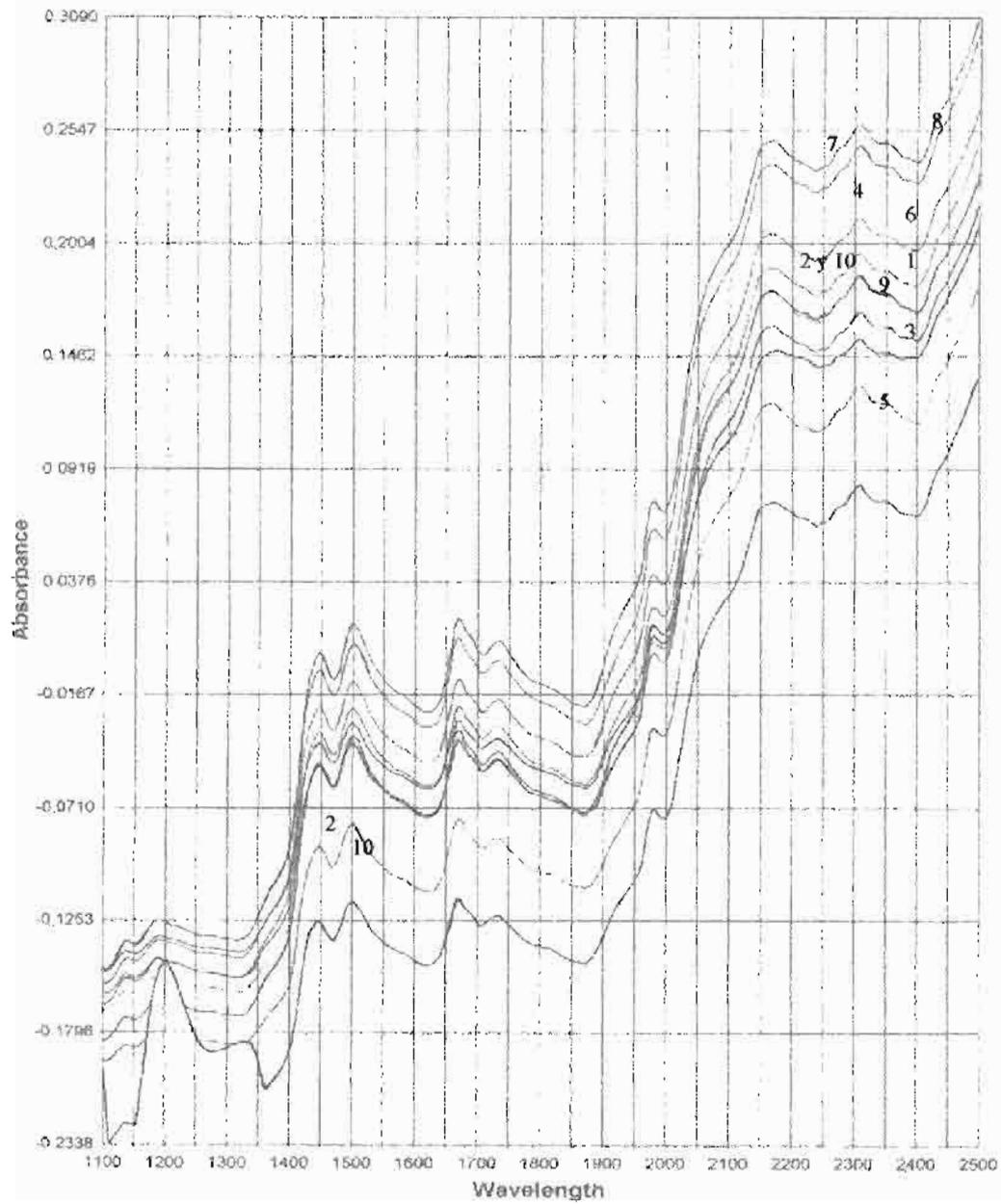
ANALISIS TERMICO



Termograma de la muestra 14

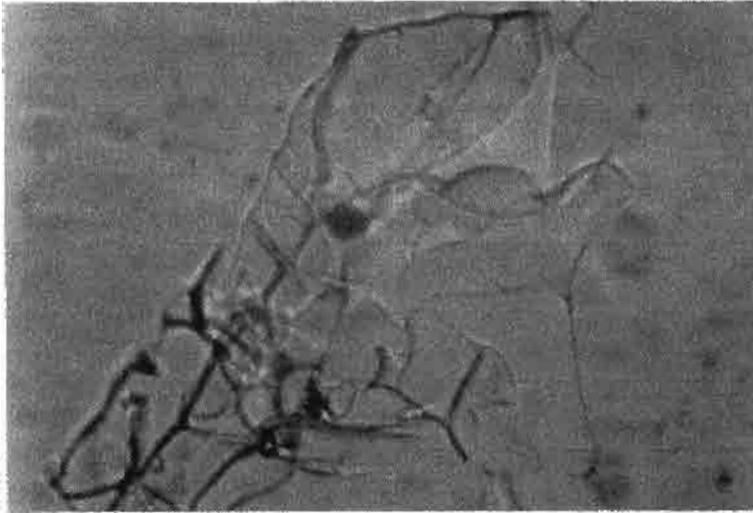
APÉNDICE F
GRÁFICAS DE NIR

Espectros en infrarrojo cercano de las primeras 10 muestras

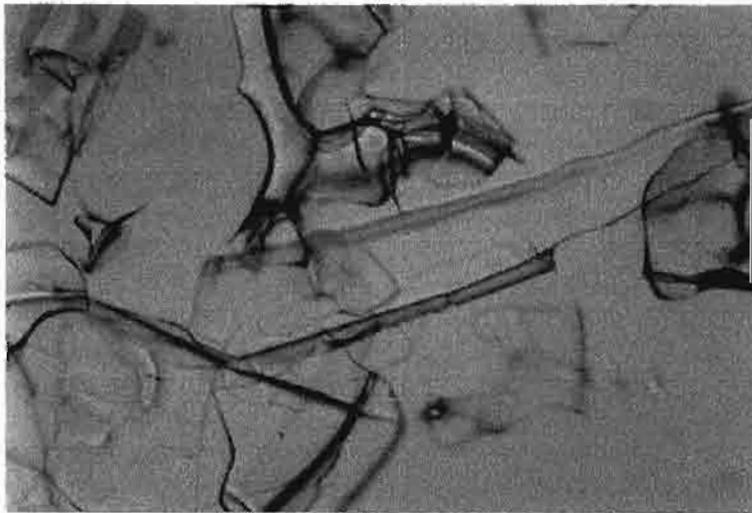


APÉNDICE G

FOTOGRAFIAS DE CRISTALINIDAD



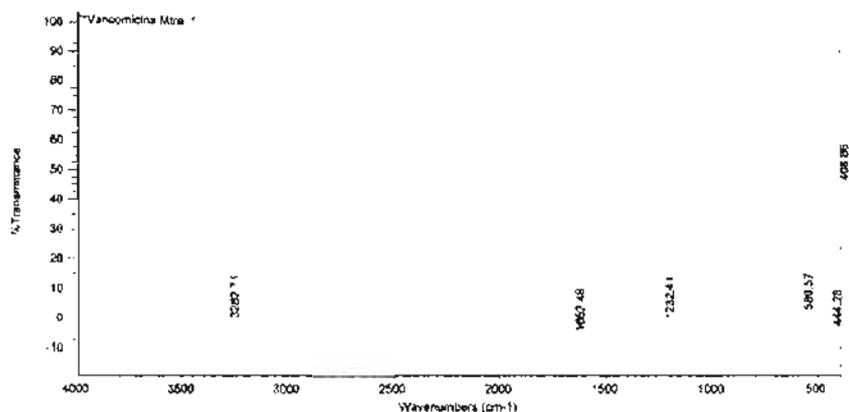
Fotografía en 40 x de la muestra 5



Fotografía en 40 x de la muestra 2

APÉNDICE H

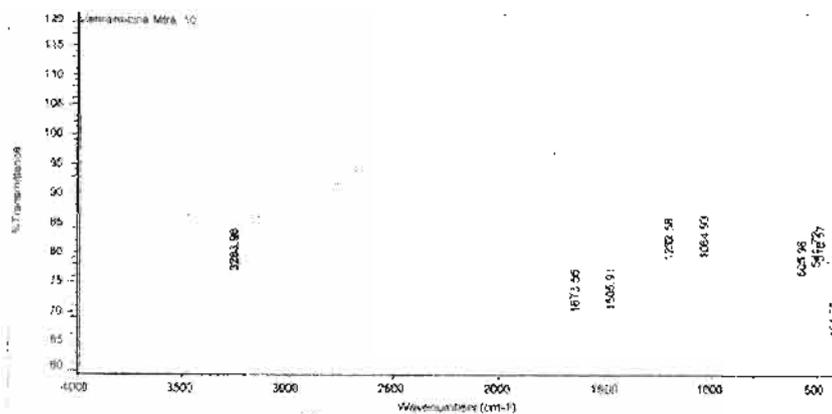
ESPECTROS EN INFRAROJO LEJANO



Fr Apr 19 16:42:09 2002
 FIND PEAKS
 Spectrum: Vancomicina Mtra 1
 Region: 4000.00 - 400.00
 Absolute threshold: 102.944
 Sensitivity: 27
 Peak list:

Position	Intensity
1652.48	9.979
444.28	5.945
1232.41	13.973
3282.71	14.523
580.57	14.958
408.96	56.630

Principales bandas en el espectro de Infrarrojo lejano para la muestra 1



Fr Apr 19 20:15:14 2002
 FIND PEAKS
 Spectrum: Vancomicina Mtra 10
 Region: 4000.00 - 400.00
 Absolute threshold: 95.562
 Sensitivity: 35
 Peak list:

Position	Intensity
454.56	72.013
1673.56	77.270
1505.91	77.611
1084.50	82.271
645.96	83.868
3293.66	84.102
541.27	84.884

Principales bandas en el espectro de Infrarrojo lejano para la muestra 10

APÉNDICE I

ESPECTROS DE ABSORBANCIA A 200 nm Y 280 nm

Fixed Wavelength Report Date: 4/20/02 Time: 10:29:21 Page: 1 of 2
IDENTIDAD

Method File: VO.M (modified) Last Update: Date: 4/10/02
Time: 10:29:11 AM
Information: VANCOMICINA
Data File: Created: 4/20/02
10:39:04

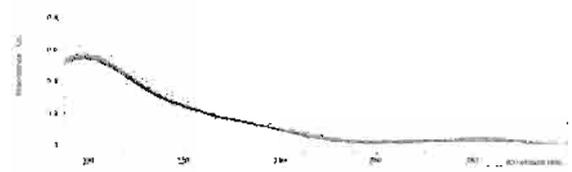
Overlaid Spectra



#	Nome	Abs-190nm-	Abs-179nm-	Abs-160nm-
1	Muestra 1	0.49173	0.49575	0.49431
2	Muestra 2	0.52745	0.52963	0.51711
3	Muestra 3	0.57257	0.57509	0.57332
4	Muestra 4	0.59101	0.59489	0.59157
5	Muestra 5	0.63425	0.63761	0.63441
6	Muestra 6	0.58287	0.58528	0.58384
7	Muestra 7	0.56516	0.56971	0.56877
8	Muestra 8	0.56217	0.56502	0.56376
9	Muestra 9	0.54912	0.55169	0.55031
10	Muestra 10	0.54631	0.54909	0.54778
11	Muestra 11	0.53349	0.53599	0.53447
12	Muestra 12	0.53393	0.53632	0.53478
13	Muestra 13	0.52739	0.53034	0.52888
14	Muestra 14	0.51811	0.52137	0.52072
15	Muestra 15	0.54067	0.54312	0.54185
16	Muestra 16	0.54027	0.54307	0.54154
17	Muestra 17	0.53191	0.53518	0.53297
18	Muestra 18	0.55049	0.55325	0.55192
19	Muestra 19	0.53410	0.53670	0.53543
20	Muestra 20	0.61969	0.62263	0.62112

Gráfica de absorbancia de las 20 muestras a 200 nm

Overlaid Spectra



#	Nome	Abs-280nm-	#	Nome	Abs-180nm-
1	Muestra 1	0.264	17	Muestra 17	0.261
2	Muestra 2	0.242	18	Muestra 18	0.243
3	Muestra 3	0.290	19	Muestra 19	0.268
4	Muestra 4	0.258	20	Muestra 20	0.227
5	Muestra 5	0.285			0.282
6	Muestra 6	0.241			0.266
7	Muestra 7	0.243			0.241
8	Muestra 8	0.257			0.242
9	Muestra 9	0.266			0.242
10	Muestra 10	0.242			0.242

Report generated by: P. SANDRA Signature:

*** Fixed Wavelength Report ***

Gráfica de absorbancia de las 20 muestras a 280 nm