

EFFECTS OF THE FUNDAMENTAL PROPERTIES OF AMPICILLIN RAW MATERIAL IN THE DERIVATIVE PROPERTIES

EFFECTS OF THE FUNDAMENTAL PROPERTIES OF AMPICILLIN RAW MATERIAL IN THE DERIVATIVE PROPERTIES

Julie F. BENAVIDES A.¹, Esther J. IBARRA J.¹, Érica J. OBANDO M.¹, Juliana PÉREZ L.¹,
Gloria E. TOBÓN Z.¹ y Óscar A. FLÓREZ A.^{1*}

Recibido: Julio 17 de 2006 Aceptado: Abril 17 de 2007

RESUMEN

Los agentes antimicrobianos son, con frecuencia, los productos que generan más dudas en cuanto su efecto terapéutico, ya que no son pocos los casos en los cuales se ha presentado diferente eficacia clínica entre productos de un mismo principio activo pero de diferentes laboratorios; por lo tanto, es necesario realizar estudios que puedan proporcionar respuestas al por qué de estas variaciones en estos principios activos, y que apunten a acabar o, por lo menos, reducir, las eventuales diferencias entre estos productos terapéuticos. En este sentido, este trabajo busca evaluar los resultados de las características fundamentales (forma externa, estructura interna, e identificación física y química) de ampicilina en polvo, utilizando un producto de marca (polvo en cápsulas), uno genérico (polvo en cápsulas), y diferentes formas cristalinas de la materia prima (en polvo), obtenidas por recristalización en diferentes solventes y a temperatura ambiente. Luego de determinar las propiedades fundamentales de todos los sólidos anteriores, se comparan entre sí basados en los resultados obtenidos en propiedades derivadas como son los perfiles de disolución, analizados por medio de los factores de diferencia y de similitud (f_1 , f_2), y los índices de eficacia microbiana (por medio de la concentración mínima inhibitoria, CMI).

Palabras clave: Ampicilina, propiedades fundamentales, propiedades derivadas, perfiles de disolución, factor de similitud, concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

Antimicrobial agents often generate doubts concerning their therapeutic effects; it is not infrequent to find differences in the clinical effectiveness among products of the same active principle made by different laboratories. It is, therefore, necessary to carry out studies as to the reasons of such variations in order to reduce or eliminate differences in the therapeutic products. We evaluated the fundamental characteristics (external form, internal structure, and physical and chemical identification) of ampicillin powder using a trade name product (powder in capsules), a generic one (powder in capsules), as well as different crystalline forms of the raw material (also in powder), obtained by recrystallization in different solvents at room temperature. After determining the fundamental properties of the aforementioned solids, they were compared on the basis of the results obtained in their derivative properties such as the dissolution profiles analyzed by means of the difference and similarity factors (f_1 , f_2), and the antimicrobial effectiveness indexes by means of the minimal inhibitory concentration (MIC).

Keywords: Ampicillin, fundamental properties, derivative properties, dissolution profiles, similarity factor, inhibiting minimum concentration.

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: oflorez@farmacia.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

La familia más numerosa de antimicrobianos, y la más utilizada en la práctica clínica colombiana y en muchos otros países del mundo, es la de los betalactámicos, ya que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. La presencia de un anillo betalactámico define químicamente esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactámicos e inhibidores de las betalactamasas (1). En este estudio se selecciona la ampicilina por sus importantes características, como su amplio espectro de actividad, alto consumo entre la población y fácil adquisición en el mercado, con relación a otros miembros del grupo farmacológico de antibióticos. La ampicilina se presenta como un polvo blanco o ligeramente blanco, con un punto de fusión de 208 °C (2, 3).

Las propiedades fundamentales de los sólidos empleados como materias primas en la manufactura de productos farmacéuticos son: el tamaño (distribución) de la partícula, la forma estructural externa (hábito), la estructura interna, el área superficial, y la misma composición química, entre otros. Como consecuencia de la variación de una o más de las propiedades fundamentales de una sustancia, se pueden modificar, a su vez, otras propiedades llamadas derivadas que, como su nombre lo indica, son dependientes de las anteriores. Entre los principales ejemplos de las propiedades derivadas se encuentran las características reológicas (propiedades de flujo), la densidad y el volumen granular, la porosidad, la compactación, la consolidación, la solubilidad y la disolución. Por lo tanto, las propiedades derivadas de las materias primas dan como consecuencia las características finales de la forma de dosificación farmacéutica.

Existen numerosos reportes de efectos negativos sobre las propiedades derivadas al modificar las fundamentales, por ejemplo, disminuyendo el tamaño de las partículas se puede mejorar la disolución de los fármacos, ya que se aumenta el área superficial efectiva y, por lo tanto, el área de contacto del soluto con el solvente; sin embargo, y paradójicamente, algunas veces, si se disminuye excesivamente el tamaño, se pueden obtener partículas micropulverizadas muy finas, que incrementan la atracción electrostática entre partículas por medio de fuerzas de Van der Waals, lo que unido a una relativa hidrofobicidad de la sustancia hace

que, presumiblemente se presenten fenómenos de aglomeración entre ellas, dando como consecuencia el fallo de la prueba de disolución (4). También se pueden encontrar problemas en la uniformidad de dosificación, la eficiencia y el flujo de polvos en las máquinas de compresión de tabletas, lo que puede variar la dureza, la friabilidad y la compresibilidad de los preparados sólidos farmacéuticos (5).

En la Farmacopea de los Estados Unidos (USP29) se encuentran algunos de los fundamentos analíticos de los métodos utilizados en la evaluación de las características fundamentales; el análisis de difracción de rayos X suministra información sobre la estructura interna de los sólidos y de la forma cristalina, mezclas de formas polimórficas, mezclas de formas cristalinas y amorfas en diferentes proporciones; los análisis térmicos, como la calorimetría de barrido diferencial (DSC), pueden ayudar a identificar diferencias estructurales, determinando el porcentaje de cristalinidad; o por medio de la diferencia del punto de fusión de una sustancia pura con respecto a las mezclas con impurezas, como es el caso de los productos de degradación, es posible determinar las trazas de solventes o la presencia de formas polimórficas (6, 7).

Entre las propiedades derivadas de los sólidos, la prueba de disolución es una de más significativas, y puede ser evaluada calculando la liberación de la sustancia en un solvente a un tiempo determinado, o realizando un perfil tomando muestras a varios tiempos diferentes durante el proceso de disolución. En este trabajo se emplea la última técnica. La FDA, en su guía de Comparaciones de Perfiles de Disolución, establece que se puede efectuar la comparación de perfiles de disolución tanto recurriendo a métodos estadísticos independientes como dependientes del modelo (8, 9).

Los métodos independientes del modelo, que sólo se basan en la comparación de los 2 perfiles en sus tiempos de muestreo, calculan los factores de diferencia (f_1) y similitud (f_2) entre las muestras, tomando los valores medios de disolución de las curvas a comparar, en cada intervalo de tiempo. El factor de diferencia (f_1) mostrado en la ecuación 1, evalúa la diferencia en porcentaje entre las dos curvas en cada punto de muestreo y es una medida del error relativo entre las dos curvas (10,11).

$$f_1 = \left\{ \left[\sum_{i=1}^n |R_i - T_i| \right] / \left[\sum_{i=1}^n R_i \right] \right\} 100 \text{ (Ec. 1)}$$

Donde n es el número de puntos de muestreo, R_i es el valor de disolución del producto de referencia

en el tiempo t , y T_t es el valor de disolución del producto a comparar.

El factor (f_2) es una transformación logarítmica del recíproco de la raíz cuadrada de la suma del cuadrado del error, y es una medida de la similitud en el porcentaje de disolución entre las curvas de los perfiles de disolución obtenidos de las sustancias de prueba y de referencia. Este factor se calcula a partir de la media de los perfiles de disolución en cada uno de los tiempos de muestreo (12).

En la ecuación (2) se muestra la forma de calcular el factor f_2 o factor de similitud.

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{0.5} 100 \right\} \quad (\text{Ec. 2})$$

Dependiendo de como se vaya a aplicar la muestra y del tipo de forma de dosificación a ensayar, las ecuaciones se pueden analizar de diferentes formas buscando cuál es más conveniente estadísticamente (13, 14, 15). Quizás la interpretación más generalizada es la siguiente: Si los valores de f_1 están cercanos a 15 (0-15%), se estima que las curvas no son muy diferentes; y si f_2 es mayor de 50, indica que el par de perfiles comparados son similares (16).

La forma directa para evaluar la efectividad del antibiótico es emplear otra de las propiedades derivadas, conocida como concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta prueba, además de confirmar resistencias inusuales de los antibióticos, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. En este caso, la prueba de CMI es complementaria a la prueba de disolución, valorando la mínima cantidad del antimicrobiano ($\mu\text{g/mL}$) necesaria para impedir el crecimiento bacteriano para cada una de las formas sólidas ensayadas (17).

La relación más importante entre la CMI y la disolución de la ampicilina como materia prima es que en los antibióticos penicilámicos lo primordial en el efecto es el tiempo en que la concentración se mantenga por encima de la concentración efectiva, y es menos importante qué tan alta sea la concentración (18).

De otra parte, se ha demostrado en algunos estudios que la ampicilina anhidra tiene mejor biodisponibilidad que la forma trihidrato, por lo cual es muy valioso definir cuál de estas 2 formas se utiliza en los productos terminados (19).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recristalización de la ampicilina

Se recristaliza la ampicilina materia prima en tres solventes de diferente polaridad: acetonitrilo, etanol y metanol, todos grado analítico, a partir de una muestra cedida amablemente por un laboratorio farmacéutico nacional que la emplea en su manufactura, luego de cumplir con los análisis de control de calidad. Las recristalizaciones se llevan a cabo a 25° C, empleando el método clásico de saturación del solvente.

Propiedades fundamentales

Las pruebas se realizan a las tres diferentes formas sólidas de ampicilina: La materia prima (MP) original, las recristalizadas en acetonitrilo (ACN), en etanol (EtOH) y en metanol (MetOH), y a 2 productos terminados, sólidos finamente pulverizados y adquiridos en farmacias, uno de marca comercial (MARC), y el otro con nombre genérico (GEN).

Forma externa: (hábito cristalino). Se observa tomando microfotografías digitales mediante un estereoscopio y un microscopio conectados a un computador. Para esta prueba, las partículas se suspenden en silicona líquida.

Tamaño: Todas las muestras se pasan por tamiz de malla 200.

Estructura interna: Se determinan los cambios en la estructura interna producidos por los cambios físicos de la forma sólida de ampicilina por medio de difracción de rayos X de polvos (DRXP) y por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para los difractogramas de rayos X se utiliza el método de Debye-Scherrer, en un difractor Rigaku Miniflex CN2005, con fuente de Cu, con filtro de níquel, en un rango de 0–90 θ , 4000 cps y a 2 θ /min. La Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC), se realiza en un DSC 200 PC “phox”, marca Netzsch, en un rango de 25 a 300 °C a 10 °C/min.

Identificación del tipo de ampicilina

Para establecer si hay presencia de ampicilina sódica, la muestra se pone en contacto con una solución acuosa HCl 0.2M. El ensayo es negativo si no se presenta precipitado. Para determinar si es ampicilina anhidra o trihidrato, la muestra en solución acuosa se deja secar a una temperatura de

entre 80 y 100 °C, y se evalúa la pérdida de peso; si esta pérdida está en el rango de 12 a 14% se trata de ampicilina trihidrato (20).

Evaluación de las propiedades derivadas

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Para esta prueba las formas de ampicilina se evalúan frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*, empleando una concentración del inóculo 300×10^6 m.o, según la escala de McFarland, luego se incuba a 37 °C durante 18-20 h. Las diluciones del antibiótico son: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, y 0.1562 mg/ml, para *E. Coli*, y de 0.3125, 0.1563, 0.07815, 0.039075, y 0.0195375 mg/ml, para *S. Aureus*, ambos en buffer fosfato. Los microorganismos se inoculan en agar Müeller-Hinton. En cada caja se colocan las 6 concentraciones de la muestra y se adicionan 0.05 mL del antibiótico.

Perfiles de disolución: Para el medio de disolución se utiliza agua destilada a una temperatura de 37°C, con agitación por paletas. Las muestras se toman cada 5 minutos, finalizando en 45 minutos.(21) La concentración de ampicilina liberada en cada tiempo se determina por espectrofotometría U.V. a una longitud de onda 320 nm (22).

RESULTADOS

En las microfotografías (figuras 1, 2, y 3) de ampicilina recristalizada en diferentes solventes se observa mayor similitud en la forma externa entre los sólidos obtenidos en metanol y etanol, los cuales presentan un aspecto planar regular, mientras que los recristalizados en acetonitrilo son de menor tamaño, con forma de prisma y más alargados.



Figura 1. Cristales de ampicilina recristalizada en Acetonitrilo. Objetivo de 10x.

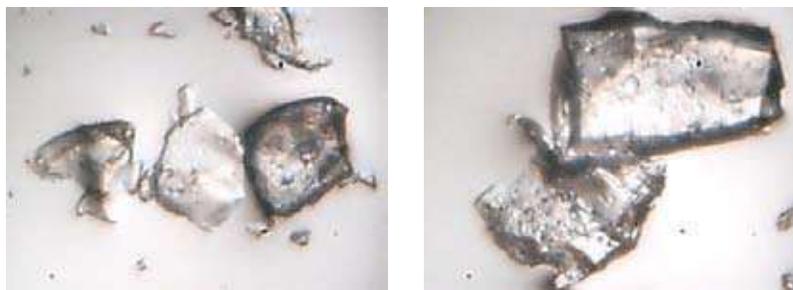


Figura 2. Cristales de ampicilina recristalizada en Etanol. Objetivo de 10x.



Figura 3. Cristales de ampicilina recristalizada en Metanol. Objetivo de 10x.

Al realizar la prueba de identificación, todas las muestras en solución acuosa permanecen transparentes e incoloras y la pérdida de peso está entre el 12 y el 14%, lo que indica que se trata de ampicilina trihidrato.

Los difractogramas de rayos X (figura 4) obtenidos para cada sólido, evidencian la presencia de dos formas claramente diferenciables: una amorfa y otra cristalina. Al primer grupo pertenecen los difractogramas con picos imprecisos, propios de esta clase de sólidos, en donde se encuentran las muestras de ampicilina de EtOH, MetOH y MARC. En el otro grupo se observan picos claramente definidos, característicos de los sólidos cristalinos con una estructura interna organizada. A éstos pertenecen los cristales de ampicilina MP, GEN y ACN.

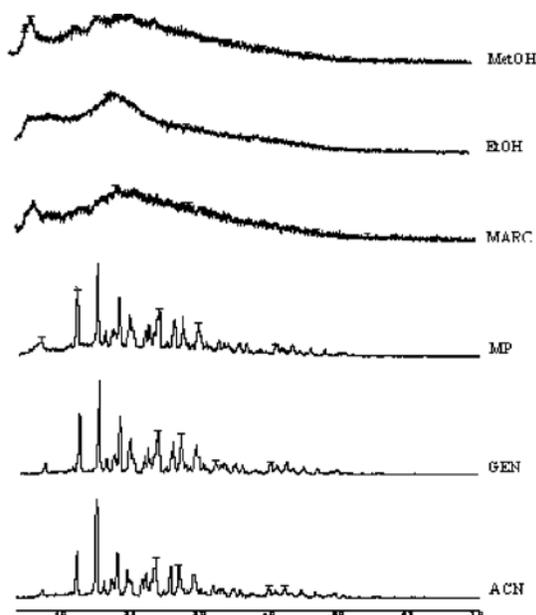


Figura 4. Difractogramas de las 6 muestras. En la gráfica cada una de las divisiones es de 10 grados θ .

En el análisis de DSC (figura 5), se observa que algunas muestras presentan un pico endotérmico a temperaturas menores de 50°C, debido posiblemente a la liberación del solvente. Este pico es muy prominente para EtOH y MetOH, y menor para MP, y MARC.

Luego se encuentra evidencia de la liberación de agua de hidratación justificada en picos endo-

térmicos pronunciados con valores de temperatura entre 70 y 100°C, presentes en las muestras de ampicilina MP, GEN, MARC y ACN. Este pico apenas se evidencia en las muestras de EtOH y MetOH. Posteriormente se observa un pico endotérmico cercano a 200°C, que puede ser atribuido al punto de fusión de la ampicilina(23). Éste aparece en algunas muestras solapado por los picos endotérmicos provenientes de solventes remanentes. Las muestras GEN y MARC presentan un pico exotérmico aproximadamente a 235°C, que no aparece en los demás termogramas y que posiblemente se debe a la presencia de estearato de magnesio, utilizado como lubricante en la forma farmacéutica final (24, 25).

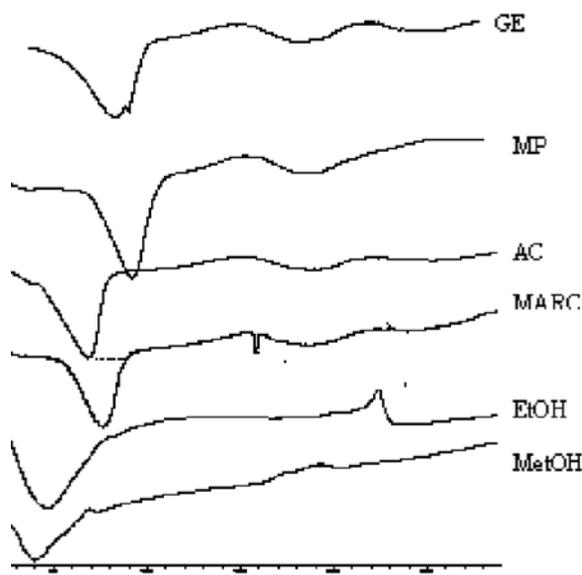


Figura 5. Termogramas DSC para las muestras de ampicilina materia prima (MP), recristalizadas (MetOH, EtOH, ACN) y los productos terminados (GEN, MARC). Cada una de las divisiones de la gráfica se expresa por intervalos de 50°C.

Las 6 muestras ensayadas presentan todos los mismos resultados en la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI). Para *E. coli*, una concentración de 0.625mg/mL, y para la cepa de *S. Aureus* de 0.07815 mg/ml.

Los resultados de los perfiles de disolución de las diferentes muestras se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de ampicilina encontradas en el perfil de disolución de cada una de las muestras.

Tiempo (t)	Metanol (MetOH)	Etanol (EtOH)	Acetonitrilo (ACN)	Materia prima (MP)	Genérico (GEN)	Marca (MARC)
0	0	0	0	0	0	0
5	0.0445	0.017	0.0133	0.018	0.013	0.042
10	0.195	0.0328	0.0247	0.023	0.023	0.042
15	0.29	0.0603	0.0473	0.028	0.036	0.047
20	0.4	0.076	0.048	0.041	0.047	0.054
25	0.395	0.0848	0.0713	0.043	0.050	0.057
30	0.4475	0.0948	0.0747	0.049	0.055	0.057
35	0.455	0.0965	0.0757	0.051	0.069	0.061
40	0.477	0.1028	0.079	0.053	0.082	0.067
45	0.46	0.1127	0.0787	0.055	0.096	0.069

Con los valores de disolución de todas las curvas en cada intervalo de tiempo se calculan mediante los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2) mostrados en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Factor de diferencia porcentual (f_1) encontrado entre cada una de las muestras de ampicilina.

MetOH _ EtOH	MetOH _ ACN	MetOH _ MP	MetOH _ GEN	MetOH _ MARC
78,59	83,80	88,59	85,15	84,32
EtOH _ ACN	EtOH _ MP	EtOH _ GEN	EtOH _ MARC	ACN _ MP
24,32	47,00	31,55	37,80	31,40
ACN _ GEN	ACN _ MARC	MP _ GEN	MP _ MARC	GEN _ MARC
16,09	23,54	32,92	28,73	34,40

Tabla 3. Porcentaje del Factor de similitud (f_2) entre las curvas de perfiles de los pares de ampicilina.

MetOH _ EtOH	MetOH - ACN	MetOH _ MP	MetOH _ GEN	MetOH _ MARC
97.59	97.45	97.32	97.41	97.43
EtOH _ ACN	EtOH _ MP	EtOH _ GEN	EtOH _ MARC	ACN _ MP
99.82	99.66	99.78	99.80	99.84
ACN _ GEN	ACN _ MARC	MP _ GEN	MP _ MARC	GEN _ MARC
99.95	99.98	100.12	100.15	100.03

Los valores menores obtenidos del factor de diferencia de disolución (f_1) son:

Entre las muestras recristalizadas EtOH-ACN (24,32%); entre las muestras recristalizadas y los productos terminados ACN-GEN (16,09%); y entre los productos (34,40%). Sin embargo, ninguno de ellos está dentro del rango recomendado de 0 a 15%.

En la evaluación del factor de similitud (f_2), se obtienen los siguientes resultados:

Todos presentan valores mayores del 97%, lo cual hace a todos los pares de curvas comparadas similares y equivalentes.

CONCLUSIONES

La reacción del solvente con los sólidos puede cambiar la estructura externa e interna de una sus-

tancia y, como consecuencia, se pueden modificar sus propiedades fisicoquímicas (color, dureza, entalpía, hábito, puntos de fusión y solubilidad, entre otros) que eventualmente pueden llegar a afectar su biodisponibilidad. Las microfotografías de las muestras recristalizadas muestran una mayor semejanza en el hábito cristalino entre las ampicilinas EtOH y MetOH, y una notable diferencia entre éstas y la de ACN.

En pruebas como la concentración mínima inhibitoria (CMI), y la prueba de similitud en los perfiles de disolución (f_2), no se presenta ningún indicio que haga suponer la diferencia terapéutica entre las muestras ensayadas.

La ampicilina puede presentarse en forma anhidra, sódica o trihidratada. Todas las muestras de este estudio, recristalizadas o productos terminados, mostraron ser de la forma trihidratada, que es la

estructura menos biodisponible de acuerdo con lo reportado.

El análisis conjunto de los difractogramas de Rx y los termogramas por DSC, indican una semejanza entre las muestras recristalizadas en ACN con respecto al producto terminado GEN; esto se suma a los datos del factor de diferencia (f_1) en donde se encuentran las menores discrepancias. La materia prima empleada (MP) muestra mayores similitudes con ACN que con cualquiera de las otras 2 muestras recristalizadas en este trabajo.

También se podría decir, pero con menor precisión, que la muestra ACN se asemeja a la materia prima empleada (MP). De igual manera, se encuentra una estrecha relación entre las ampicilinas de EtOH y de MetOH, y mayor cercanía entre estas 2 últimas con el producto terminado MARC, que éste con la de ACN.

Con este estudio se introduce a la estimación de las propiedades fundamentales de una materia prima, lo cual establece el comportamiento que ésta pueda tener en la elaboración de la respectiva forma farmacéutica; así se brindan a la industria farmacéutica y afín algunas rutinas que ayudan a la selección de los insumos y en el proceso de manufactura.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Antioquia, y al Comité para el desarrollo de la Investigación CODI de la Facultad de Química Farmacéutica, por el apoyo financiero al proyecto “Efectos de las propiedades fundamentales de ampicilina materia prima en la eficacia antimicrobiana”, que se inició en Marzo de 2005 y se terminó en Junio de 2006.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marín M, Gudiol F. Formación médica continuada. Antibióticos betalactámicos. Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin 2003; 21(1):55-42.
2. DrugBank. DrugBank Ampicillin (APRD00320). Disponible en: URL: <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=APRD00320>. Consultado: 10 de noviembre de 2006.
3. American Pharm Partners Inc. Ampicillin and sulbactam for injection, USP. Disponible en URL: http://www.appdrugs.com/Pis/Ampicillin_and_Sulbactam_451008.pdf. Consultado: 10 de noviembre de 2006.
4. Martin A. Physical Pharmacy. Principles in Pharmaceutical Science. 3a. ed. Filadelfia; Lea & Febiger; 1973; pp. 595-585.
5. Swarbrick J, Boyland J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 6. Nueva York: Marcel Dekker; 1990; pp. 166-141.
6. USP 29-NF 24. Farmacopea de los Estados Unidos de América 29. Formulario Nacional 24. Compendio de Normas Oficiales. Edición anual en español, United States Pharmacopeial Convention Incorporated. Toronto, Canadá 2006. <941>, <891>: 3036, 3025-3024.
7. Swarbrick J, Boyland J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 1. Nueva York: Marcel Dekker; 1990; pp.14-18.
8. FDA Food and Drug Administration. (Draft) Guidance for Industry: BA and BE Studies for Orally Administered Drug Products—General Considerations. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 1999.
9. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Draft. London, England: Committee for Proprietary Medicinal Products; 1998.
10. Moore J, Flanner H. Mathematical comparison of dissolution profiles. J Pharm Tech Sci 1996; 20 (6): 64-74.
11. Committee for Proprietary Medicinal Products. Note for Guidance on Quality of Modified Release Products: A: Oral Dosage Forms, B: Transdermal Dosage Forms. Section I (Quality). CPMP/QWP/604/96. Londres: Committee for Proprietary Medicinal Products; 1999.
12. FDA Food and Drug Administration. (Draft) Guidance for Industry: Waiver of *in vivo* BA and BE. Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Containing Certain Active Moieties/Active Ingredients Based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research; 1999.
13. Reseigno A. Bioequivalence. Pharm Res 1992; 9: 925-928.
14. Langenbucher F. Linearization of Dissolution Rate Curves by Weibull Distribution. J Pharm Pharmacol 1972; 24: 979-981.
15. Fariña J, Labrés M. Statistical comparison of the dissolution curves of controlled release solid oral dosage forms. Drug Dev Ind Pharm 1987; 13 (6):1107-1118
16. Shah V, Tsong Y, Sathe P, Liu J. *In vitro* Disolution Profile Comparison-Statistics and Analysis of Similary Factor, f_2 . Pharm Res 1999; 15: 889-896.
17. Andrews M. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. J Antimicrob Chemother 2001; 48 (Suppl 31): 5-16.
18. Calderón J. Consideraciones generales sobre el uso de antimicrobianos. Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos. 7 ed. México; Méndez Cervantes; 1997. 53-85.
19. Kim Y. Crystallization and Solid-state Transformation of Pseudopolymorphic Forms of Sodium Naproxen. [Tesis doctoral]. Georgia Institute of Technology; 2005.
20. OMS Organización Mundial de la Salud. Pruebas básicas para sustancias farmacéuticas. Serie de informes técnicos. No. 704. Informe 29° 1986. Ginebra. 21-18.
21. USP 29-NF 24. Farmacopea de los Estados Unidos de América 29. Formulario Nacional 24. Compendio de Normas Oficiales. Edición anual en español. Toronto: United States Pharmacopeial Convention Incorporated; 2006. <711>, 2919-2912.
22. Pajchel G, Borowiecka B, Chojnowski W. Comparison of Spectrophotometric and Colorimetric Methods in Determination of Clavulanic Acid. Acta Pol Pharm 1992; 49(3):17-21
23. Ivashkiv E. Ampicillin. En: Florey K. Analytical Profiles of Drug Substances, vol. 2. NuevaYork: Academic Press; 1973.
24. Han J, Suryanarayanan G. Applications of Pressure Differential Scanning Calorimetry in the Study of Pharmaceutical Hydrates. II. Ampicillin Trihydrate. Int J Pharm 1998; 170 (1): 63-72.
25. Giron D. Thermal Análisis and Calorimetric Methods in the Characterization of Polymorphs and Solvates. Thermochim Acta 1995; 248: 59-1.