

Utilización de un Programa de Cómputos para la Determinación Analítica de Ciprofloxacina por Espectroscopía Derivativa, en Estudios de Absorción Gastrointestinal

MARIA G. VOLONTE

Cátedra de Ensayo y Valoración de Medicamentos, Area Producción y Ensayo
de Medicamentos, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP,
calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina

RESUMEN. Se propone una metodología analítica selectiva, dirigida a estudiar la absorción gastrointestinal de ciprofloxacina, utilizando modelos *in vitro* que operen con membranas naturales. El método consiste en diferenciar, respecto a la longitud de onda, los valores de absorbancia registrados con un espectrofotómetro convencional, para generar la derivada de primer orden, con ayuda de un programa de cómputos adecuado, eliminando las interferencias que provocan las sustancias naturales liberadas por las membranas gastrointestinales. Se validó el método mediante el uso de un espectrofotómetro computarizado y se efectuaron estudios de correlación de ciprofloxacina en presencia y ausencia de las sustancias interferentes. Los resultados permiten afirmar que la metodología propuesta constituye una alternativa analítica válida para efectuar el seguimiento de la absorción de ciprofloxacina.

SUMMARY. "Utilization of a Computation Software for the Analytical Determination of Ciprofloxacin by Derivative Spectroscopy in Gastrointestinal Absorption Studies". This work presents a selective analytical method to study gastrointestinal absorption of ciprofloxacin, using a *in vitro* model that operates with natural membranes. Supported by a suitable computation software, absorbance data from a conventional spectrophotometer are differenced with regards to wavelengths to obtain the first order derivative, in order to avoid interferences with substances released from the gastrointestinal membranes. The method was validated with a computerized spectrophotometer. Correlation studies of ciprofloxacin, with and without the presence of interfering substances, were made. The results show that it is a useful methodology for checking ciprofloxacin absorption.

INTRODUCCION

La ciprofloxacina es un agente antimicrobiano de amplio espectro, contra gérmenes gram (+) y gram (-), perteneciente a la nueva generación de quinolonas fluoradas¹⁻⁶.

La literatura científica no es coincidente en lo referente a su absorción luego de ser administrada por vía oral. Crump *et al.*⁷ concluyen que la ciprofloxacina es bien absorbida, mientras que Paulsen⁸ y Stahlmann⁹ manifiestan que la absorción es par-

PALABRAS CLAVE: Ciprofloxacina; Absorción *in vitro*; Espectroscopía derivativa; Programa de cómputos.

KEY WORDS: Ciprofloxacin; *In vitro* absorption; Derivative Spectroscopy; Computation software.

cial. Asimismo Siefert *et al.*¹⁰ trabajando con ratas y monos demuestran que la droga se absorbe sólo parcialmente (30–40%) en ambas especies.

Como un aporte más al estudio de la absorción de este principio activo hemos abordado el análisis de su transferencia a través de las membranas gastrointestinales mediante la utilización de un modelo *in vitro*, siguiendo con la metodología empleada en anteriores trabajos^{11–13} a la cual se le han introducido algunas modificaciones.

Para realizar el seguimiento de la transferencia de la droga a través de las membranas se debe utilizar una metodología analítica que sea selectiva para ciprofloxacina y que no capte las sustancias naturales liberadas por los órganos gastrointestinales. La propuesta de la metodología empleada en el presente trabajo consiste en derivar los valores de absorbancia en la región ultravioleta, obtenidos desde un espectrofotómetro convencional, con ayuda de un programa de computación adecuado; de esta manera se soluciona el problema de las interferencias, aún en el caso de no disponer de un espectrofotómetro que emplee derivación electrónica analógica o procesamiento digital de la señal mediante microcomputadoras^{14–15}.

Para validar el método se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu 160 que deriva la señal automáticamente.

PARTE EXPERIMENTAL

En una primera instancia se realizaron estudios de estabilidad del principio activo en las condiciones de trabajo, es decir, se ensayó la incidencia de la temperatura (37 °C), burbujeo de carbógeno (mezcla oxígeno-anhídrido carbónico, 95:5), exposición a la luz y medios de disolución (solución Krebs pH 7,4, pH 6 y pH 1). El seguimiento analítico se hizo al UV a distintos tiempos: 0, 30, 60 y 120 minutos. En todos los casos

los resultados indicaron buena estabilidad de la droga.

A continuación se realizó un espectro de absorción ultravioleta derivado de orden cero y otro de primer orden de las sustancias liberadas por los órganos, utilizando el espectrofotómetro Shimadzu (Fig. 1), encontrándose que en el primer existe una manifiesta absorbancia en el rango comprendido entre 200–400 nm, mientras que en el espectro derivado de 1er. orden, a partir de 321 nm hasta 400 nm ésta no presenta señal, se hace cero.

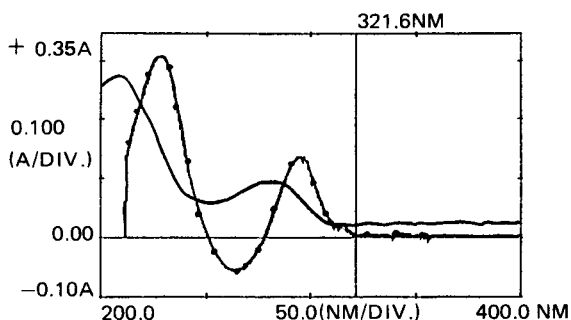


Figura 1. Espectros de absorción ultravioleta de las sustancias liberadas por las membranas gastrointestinales. — derivada orden cero. —●—●— derivada primer orden.

En la Fig. 2 pueden observarse los espectros de absorción ultravioleta derivativos de orden cero y 1er. orden de una solución de ciprofloxacina en Krebs pH 7,4 de 20 µg/ml, realizados en el mismo espectrofotómetro Shimadzu mencionado. En el primero de ellos encontramos máximos de absorción a 272 nm y a 328 nm, zonas en las cuales también absorben las sustancias naturales de las membranas gastrointestinales. En cambio en el espectro correspondiente a la 1a. derivada las máximas señales se registran a 283 y a 340 nm, seleccionándose ésta última como específica para la determinación analítica de la ciprofloxacina, ya que en ella quedan canceladas las señales interferentes.

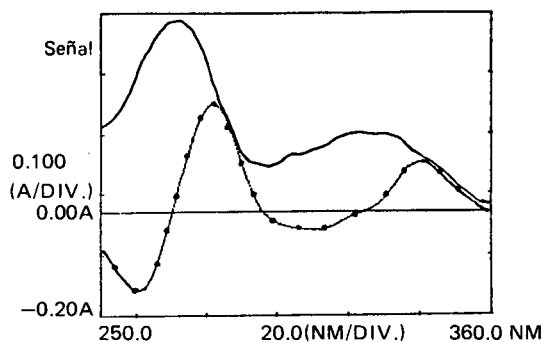


Figura 2. Espectros de absorción ultravioleta de una solución de ciprofloxacina en Krebs pH 7,4 de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, registrados con un espectrofotómetro Shimadzu 160. — Derivada orden cero. ●●● Derivada primer orden.

Mediante la utilización de un espectrofotómetro Beckman 26 se registraron lecturas de absorbancia a 335 nm y a 345 nm, rango correspondiente a la pendiente del espectro convencional que coincide con el máximo a 340 nm del espectro derivativo, y se las diferenció respecto de la longitud de onda para generar la derivada de 1er. orden, utilizando el software Lotus 123® para desarrollar y optimizar una función que resuelva este problema, aplicándolo en un ordenador IBM PC compatible.

Con la utilización de dicha función se derivó la absorbancia en el rango de longitudes de onda comprendido entre 255 y 365 nm, obteniéndose el espectro que se observa en la Fig. 3 y cuya similitud con el obtenido en el espectrofotómetro Shimadzu puede verificarse por comparación de los máximos y mínimos respectivos.

Se efectuaron estudios de correlación entre ciprofloxacina preparada en solución Krebs pH 7,4 en presencia y ausencia de las sustancias interferentes liberadas por las membranas, con el objetivo de dar sustento estadístico a la selectividad del método. Para ello se calcularon las curvas de calibración correspondientes a soluciones de la droga en Krebs pH 7,4, en Krebs pH 7,4 previamente incubada 120 minutos con "sacos"

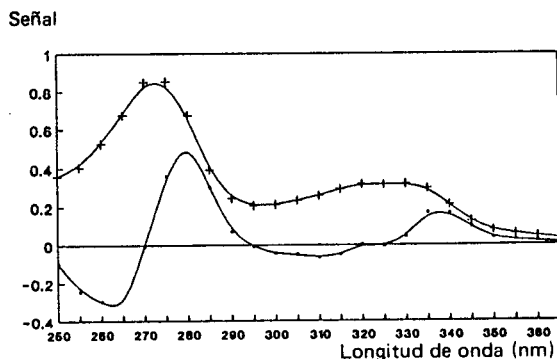


Figura 3. Espectros de absorción ultravioleta de una solución de ciprofloxacina en Krebs pH 7,4 de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, obtenidos mediante la aplicación del programa de cómputos. + + + Derivada orden cero. ●●● Derivada primer orden.

intestinales conteniendo sólo solución nutritiva y en Krebs pH 7,4 previamente incubada también 120 minutos pero con "saco" estomacal en las mismas condiciones anteriores.

Con el objeto de validar los resultados obtenidos por el método propuesto se prepararon soluciones de concentraciones entre 8–24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ciprofloxacina en Krebs pH 7,4 que se valoraron mediante lecturas en el espectrofotómetro Shimadzu UV 160 computarizado y en el espectrofotómetro Beckman 26, utilizándose el test Student para comparar los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se calculan las curvas de calibración ajustando los valores mediante la ecuación de cuadrados mínimos, trabajando en un rango de concentración de 5–25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Se aplica el test de diferencias entre dos rectas de regresión calculando los valores de F con los coeficientes de regresión de la curva de calibración realizada en solución Krebs pH 7,4 (I) y el obtenido en solución Krebs pH 7,4 incubada con el saco intestinal (II) ¹⁶. De igual manera se calcula el valor F entre el coeficiente de regresión obtenido con ciprofloxacina en solución Krebs pH 7,4 y el que proviene de la solu-

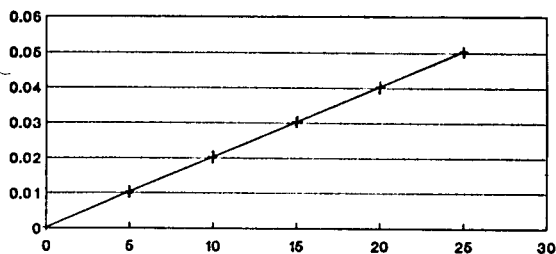


Figura 4. Curva de calibración de ciprofloxacina en solución Krebs pH 7,4. Ordenada: valores promedio de derivada de primer orden de 4 determinaciones. Abcisa: valores de concentración en $\mu\text{g/ml}$. El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$, $r = 0,9974$, $Y = 0,000506 + 0,001994 X$.

ción incubada con el saco estomacal (III). Los resultados se muestran en las Figuras 4, 5 y 6, respectivamente.

Como conclusión de esta etapa de optimización de la metodología analítica podemos expresar que de acuerdo a los valores de F calculados con los coeficientes de regresión se observa que no existen diferencias significativas entre (I) y (II) y entre (I) y (III) para un nivel de probabilidad del 0,05.

Los porcentajes recuperados de ciprofloxacina en solución Krebs pH 7,4, luego de

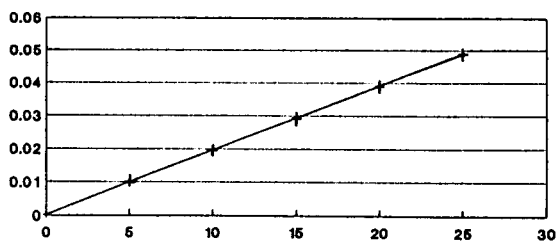


Figura 5. Curva de calibración de ciprofloxacina en solución Krebs pH 7,4 previamente incubada con sacos intestinales. Ordenada: valores promedio de derivada de primer orden de 7 determinaciones. Abcisa: valores de concentración en $\mu\text{g/ml}$. El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$, $r = 1,0006$, $Y = 0,00073 + 0,00193 X$, $F = 5,427$.

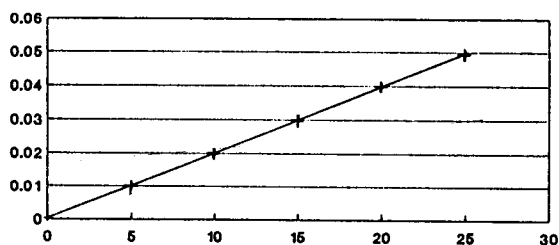


Figura 6. Curva de calibración de ciprofloxacina en solución Krebs pH 7,4 previamente incubada con sacos estomacales. Ordenada: valores promedio de derivada de primer orden de 6 determinaciones. Abcisa: valores de concentración en $\mu\text{g/ml}$. El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$, $r = 0,99743$, $Y = 0,000508 + 0,00196 X$, $F = 1,074$.

Concent. ($\mu\text{g/ml}$)	% Recuperado Shimadzu (n = 4)	C.V.	% Recuperado Beckman (n = 4)	C.V.	Nivel de Significac. ($\alpha = 0,05$)	Probabilidad de la desviac.
8	99,13	1,07	99,94	1,33	NS	0,2 < P < 0,4
12	99,84	1,90	100,39	2,28	NS	0,5 < P < 0,9
16	99,81	1,21	100,86	0,47	NS	0,1 < P < 0,2
20	100,25	1,51	99,52	0,96	NS	0,4 < P < 0,5
24	99,62	0,90	100,68	1,66	NS	0,2 < P < 0,4

Tabla 1. Porcentajes recuperados de ciprofloxacina en solución Krebs pH 7,4. Los valores tabulados corresponden a valores medios. C.V. = coeficiente de variación. NS = diferencias no significativas.

valorarlos mediante el uso del espectrofotómetro Shimadzu y del Beckman, figuran en la Tabla 1, observándose que no existen diferencias significativas entre ambos para un nivel de probabilidad del 0,05, luego de la aplicación del test de Student.

Como conclusión final, luego de analizar los resultados obtenidos, es posible afirmar que es adecuada la utilización de la meto-

dología analítica propuesta para realizar estudios cinéticos orientados a evaluar la transferencia gastrointestinal de ciprofloxacina con modelos *in vitro* que operen con membranas naturales.

AGRADECIMIENTOS. A la Dra. María Teresa Pizzorno por la lectura crítica del manuscrito y por sus valiosas sugerencias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Nix, D.E. y J.J. Schentag (1988) *J. Clin. Pharmacol.* 28: 169-78
2. González, M.A., F. Uribe, S. Duran Moisen, A. Pichardo Fuster, A. Selen, P.G. Welling y B. Painter (1984) *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 741-4
3. Sanders, W.E. (1988) *Rev. Infect. Dis.* 10: 528-43
4. Campoli-Richards, D.M., J.P. Monk, A. Price, P. Benfield, P.A. Todd y A. Ward (1988) *Drugs* 35: 373-447
5. Socías Manzano, S. (1988) *Pharmaklinik* 2: 362-71
6. Ríos Fabra, A. (1989) *Pharmaklinik* 3: 126-30
7. Crump, B., R. Wise y J. Dent (1983) *Antimicrob. Agents Chemother.* 24: 784-6
8. Paulsen, O. (1988) *Drugs of Today* 24: 361-401
9. Stahlmann, R. (1988) *Drugs of Today* 24: 529-36
10. Siefert, H.M., D. Maruhn, W. Maul, D. Forster y W. Ritter (1986) *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.* 36: 1496-502
11. Volonté, M.G., S.A. Taylor y P. Lufrano (1986) *Acta Farm. Bonaerense* 5: 149-58
12. Volonté, M.G., S.A. Taylor, C.G. Marano, M.I. Reinoso y P. Lufrano (1988) *Acta Farm. Bonaerense* 7: 169-74
13. Volonté, M.G., C.G. Marano, M.I. Reinoso y P. Lufrano (1990) *Acta Farm. Bonaerense* 9: 95-100
14. Wahbi, A.M. y S. Ebel (1974) *Anal. Chim. Acta* 70: 57-63
15. Korany, M.A., A.M. Wahbi, M.A. Elsayed y S. Mandour (1984) *Anal. Letters* 17: 1373-89
16. Sokal, R.R. y F.J. Rohlf (1984) "Introducción a la Bioestadística", Ed. Reverté, Barcelona, pág. 246