

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**INTERACCIÓN DE METALES TÓXICOS CON CEFTIZOXIMA:
COMPLEJOS CON CU Y V.**

TESIS PRESENTADA EN
LA FACULTAD DE FARMACIA
COMO ASPIRANTE AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y BIOINORGÁNICA

POR

REGINA ORENGA MENENDEZ

MADRID

12 de septiembre de 1994



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
INORGÁNICA Y BIOINORGÁNICA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 - MADRID - (ESPAÑA)

D. Antonio Luis Doadrio Villarejo, Profesor Titular del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA que el trabajo presentado por D^a REGINA ORENGA MENÉNDEZ, titulado "INTERACCIÓN DE METALES TÓXICOS CON CEFTIZOXIMA: COMPLEJOS CON CU Y V.", ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que conste, lo firmo en Madrid a 15 de septiembre de 1994.

Fdo: A.L. Doadrio Villarejo

RECONOCIMIENTOS

Deseo expresar mi profunda gratitud al Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, donde he realizado la presente Tesis Doctoral, a todos sus miembros, y en especial a su Directora, D^a María Vallet Regí.

A todos ellos, por los buenos momentos pasados, por su comprensión y por los ánimos dados en los inevitables momentos en los que la investigación no progresa.

A Mariano, que siempre está presente cuando se le necesita y siempre dispuesto a echarnos una mano, precisa y útil.

Y por supuesto, al Director de mi Tesis, Prof. Dr. Antonio Doadrio Villarejo, que con su inestimable paciencia y ayuda ha logrado que sea posible este momento.

Por Andrea y Antonio,

INDICE

	Página
RECONOCIMIENTOS	ii
INDICE	iv
INTRODUCCIÓN	vii
OBJETIVOS	1
PLAN DE TRABAJO	2
PARTE TEÓRICA	4
CEFTIZOXIMA: CARACTERÍSTICAS GENERALES	4
RELACIONES ESTRUCTURA ACTIVIDAD	13
METODOS DE DETERMINACIÓN ANALÍTICA	16
ANTECEDENTES	19
INTERACCIÓN DE METALES CON ANTIBIÓTICOS	19
PARTE EXPERIMENTAL	23
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Patrones y Reactivos	23
Soluciones Tampones	24
Instrumentación	26
Cromatografía de líquidos en fase reversa	26
Cromatografía iónica	28
pHmetro	29
Balanza	29
ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS	30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
MECANISMO DE LAS REACCIONES	32
Ceftizoxima	33
Adición de Cobre	49
Adición de Vanadio	71
Estequiometría del complejo	78
Adición de Níquel	85
REACCIONES DE HIDRÓLISIS	88
Ceftizoxima	88
Orden de la Reacción	90
Influencia del pH	90
Influencia de la temperatura	99
Ceftizoxima-Cu	103
Orden de la reacción	103
Influencia del pH	108
Influencia de la temperatura	117
Influencia de la concentración de Cobre	121
Ceftizoxima-VO	126
Orden de la reacción	126
Influencia del pH	131
Influencia de la temperatura	139
Influencia de la concentración de Vanadilo	139
Adición de Níquel	148
Orden de la Reacción	148
Influencia del pH	151
Influencia de la temperatura	157

<i>REACCIONES DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS</i>	<u>162</u>
<i>CONCLUSIONES</i>	<u>167</u>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<u>169</u>

INTRODUCCIÓN

La presente memoria que sometemos a consideración de la Comisión, es parte de una línea de trabajo del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, orientada al estudio de la interacción de iones metálicos con antibióticos β -lactámicos, eligiendo en este caso una cefalosporina de tercera generación, la Ceftizoxima, frente a dos penicilinas semisintéticas, como la Ampicilina y Amoxicilina, que fueron estudiadas en dos Tesis Doctorales anteriores. Como metales, y continuando con las líneas marcadas en las Tesis citadas, se han vuelto a elegir tres metales, Cu, V y Ni, por estar presentes en el ser humano y por tanto pueden interaccionar con el antibiótico dentro del medio biológico. El Cu^{2+} , ha sido el más estudiado, por su presencia en los medios biológicos, donde realiza acciones bioquímicas de gran importancia, como es la de oxidar el Fe(II) a Fe(III), en la ferritina, mediante una proteína específica de cobre, la ceruloplasmina, pero que a su vez, en dosis elevadas puede producir efectos tóxicos, si bien atenuados por su condición de emético. El Ni^{2+} , es un metal tóxico, con acción cancerígena demostrada en el hombre, de fácil absorción por vía respiratoria y, el VO^{2+} , como metal tóxico que está presente en las gasolinas que provienen de países iberoamericanos, cuyo consumo en España es elevado.

Para el estudio de estas interacciones, hemos utilizado como técnica de análisis la Cromatografía de líquidos (HPLC), que presenta una gran ventaja con respecto a las técnicas empleadas por otros autores en estos trabajos, como son las espectrofotométricas y potenciométricas, en donde no es posible separar el antibiótico, de sus productos de hidrólisis, ni tan siquiera, el complejo formado del antibiótico que no ha reaccionado. Tampoco, es posible la separación entre el complejo antibiótico-Me

y su producto de hidrólisis, lo que si realiza nuestra metódica de HPLC propuesta, al ser una técnica separativa.

Además, la utilización de esta técnica separativa, es más adecuada en unas reacciones que implican la aparición de diversos productos de hidrólisis y de complejación, ya que la identificación de cada pico cromatográfico, nos va a facilitar el estudio del mecanismo de esas reacciones de hidrólisis y de complejación, resultando más sencillos los cálculos de las constantes de formación e hidrólisis, al poder establecer por las áreas de cada pico cromatográfico directamente la concentración de cada uno de los componentes que intervienen en este tipo de reacciones.

OBJETIVOS

El objeto de la presente Tesis, es el estudio del posible efecto de catálisis de la reacción de hidrólisis de la Cefprozil por efecto del Cu, Ni y V, que debe conducir a la ruptura del anillo β -lactama, con la consiguiente inactivación del antibiótico, generalmente por efecto inductivo, favoreciendo así el ataque nucleofílico de un ion hidroxilo o de una molécula de agua sobre el anillo β -lactámico, establecer el posible mecanismo de acción y las constantes cinéticas de la reacción; y estudiar los efectos que, el pH, temperatura y concentración del ion metálico tienen en dicha reacción.

Por otra parte, en el caso de formarse un complejo metálico entre el metal y el antibiótico, se establecerían las constantes de formación y las termodinámicas, para establecer la naturaleza y estabilidad del complejo, con posibles referencias a la formación de un quelato estable entre el metal y el antibiótico.

PLAN DE TRABAJO

Para cumplir con los objetivos previstos, hemos desarrollado el siguiente esquema de trabajo:

En primer lugar, se hace preciso desarrollar una metodología de análisis por HPLC, que haga posible la separación de la Cefprozima de sus productos de hidrólisis y de los posibles complejos metálicos. Para ello se probarán distintas fases móviles y condiciones cromatográficas, hasta encontrar las idóneas.

También se hace necesario el establecer una metodología analítica, que haga posible la determinación del ion metálico residual, que no forma complejo, para poder determinar la constante de equilibrio de formación del complejo metálico. En este caso, la concentración del ion se encuentra en niveles traza, y por ello hemos recurrido a una técnica de cromatografía iónica con detección conductimétrica, que permite llegar a niveles de p.p.b.

El siguiente paso, es establecer los mecanismos de las reacciones de hidrólisis y de formación del complejo metálico, a partir de los datos que nos proporcionará la técnica de HPLC. Para ello, es preciso determinar primero el mecanismo de la reacción de hidrólisis de la Cefprozima y después los del complejo.

Seguidamente, se procederá a la determinación de la influencia del pH y temperatura en la reacción de hidrólisis de la Cefprozima, como fase previa a la del estudio de la influencia que ejercen el pH, temperatura y en este caso, la

concentración del ion en la reacción de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-Me. En este tipo de mecanismos hidrolíticos, se hace preciso el mantener todos los parámetros constantes, excepto el de estudio. Por ello, en primer lugar procederemos a la valoración que ejerce la influencia del pH, variando este parámetro de 2 a 8, límites entre los cuales es estable la columna cromatográfica empleada, aunque como veremos más adelante en el caso del estudio de la reacción de hidrólisis del complejo solo se puede operar a pH 2-5, al formarse hidroxocomplejos, que precipitan. En segundo lugar, se estudiará la influencia de la temperatura con variaciones de esta de 30, 40, 50 y 60 °C y por último, en el estudio de la influencia de la concentración del metal, en aquellos iones que forman complejo, se variará aquella en relaciones molares 0,5:1; 1:1; 2:1 y 3:1, Me:Ceftizoxima, lo que también nos servirá para establecer la estequiometría del complejo.

Finalmente, se establecerán las constantes de equilibrio de formación del complejo y a partir de ellas, las constantes termodinámicas (ΔG , ΔH y ΔS).

PARTE TEÓRICA

CEFTIZOXIMA: CARACTERÍSTICAS GENERALES

Uno de los acontecimientos más destacados en la ciencia contemporánea es el descubrimiento, síntesis y aplicación clínica de los antibióticos β -lactámicos. Su historia comienza con Fleming en 1928, cuando observa las propiedades líticas del *Penicillium* en cultivos de *Staphylococcus*. En 1945, el profesor G. Brotzu, observó que el agua de mar, en Sardinia, se autodepuraba, debido a la presencia de sustancias producidas por microorganismos que inhibían el crecimiento de otras bacterias. Aisló el hongo, similar al *Cephalosporium acraemonium*, la primera de las cefalosporinas, ya que si crecían en medio sólido secretaban sustancias que inhibían el crecimiento de numerosas bacterias Gram positivas y negativas (1). Las cefalosporinas son compuestos relacionados estructuralmente con las penicilinas, y más estables a las penicilasas, por este motivo, se impulsó su desarrollo y, a partir del ácido 7-amino cefalosporánico, se han llevado a cabo la preparación de un gran número de cefalosporinas semisintéticas (2).

Las cefalosporinas se clasifican en primera, segunda y tercera generación, en virtud de sus características biológicas. El criterio para la calificación como cefalosporina de tercera generación es el siguiente (3- 6):

- Elevada estabilidad a las β -lactamasas, particularmente a las producidas por las bacterias Gram negativa.
- Elevada potencia frente a todas, o al menos la mayoría de las Enterobacteriaceae.
- De moderada a buena actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*.

La Ceftizoxima es extremadamente estable a la cefalosporinasa (β -lactamasa Ia) y a la penicilinasa (β -lactamasa III). (7- 9)

La actividad bactericida de la Ceftizoxima contra numerosos bacilos Gram negativos y positivos, radica en la facilidad de penetración en la membrana externa de estas bacterias. Su actividad contra las bacterias Gram positivas estriba en la presencia de un grupo metoxiimino que estabiliza a la molécula contra el ataque de plasmidos y β -lactamasas del cromosoma y, por otra parte, por el anillo heterocíclico de aminotiazol que provoca alta afinidad por los PBPs (sitios de unión de la cefalosporina a la membrana protéica de la bacteria) (10-28). Efectiva contra las Enterobacteriaceae como *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia marcescens* y en diversas especies de *Proteus*, que la distingue de anteriores cefalosporinas y cefamicinas. Además, su espectro de acción alcanza a bacterias anaeróbicas, incluyendo especies de *Bacteroides*.(29-40)

Sin embargo, su actividad antibacterial contra la *Pseudomonas aeruginosa* es menor que en otras e incluso, algunos autores no la consideran como una cefalosporina antipseudomonas. En la Tabla I, se aprecia la buena actividad de la

Ceftizoxima contra diversas bacterias y, por contra, la mala frente a la *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se compara con una cefalosporina de la primera generación, la Cefalotina. La actividad se ha expresado en unidades M.I.C, mínima concentración inhibitoria, a una concentración del antibiótico en mg/L (3, 41).

Tabla I.- Actividad *in vitro* de Ceftizoxima con respecto a la Cefalotina, medidas en MIC (mg/L).

Organismo	Ceftizoxima	Cefalotina
<i>Proteus</i>	0,02	>100
<i>Staph.aureus</i>	1,6	0,1
<i>E.coli</i>	0,02	6,3
<i>Ps. aeruginosa</i>	12,5	>100
<i>Ser. marcescens</i>	6,3	>100
<i>Ent. aerogenes</i>	0,02	>100

Para potenciar la efectividad de la Ceftizoxima contra la *Pseudomonas aeruginosa*, se ha estudiado combinarla con un antibiótico más específico, Tobramicina. El resultado es desalentador, la Tobramicina ejerce un efecto sinergista sobre la Ceftizoxima, sin que, por el contrario, disminuya la dosis terapéutica de la Tobramicina al emplearla conjuntamente con la Ceftizoxima.(42,

43). Igualmente ocurre con la administración conjunta de otras cefalosporinas (44-46).

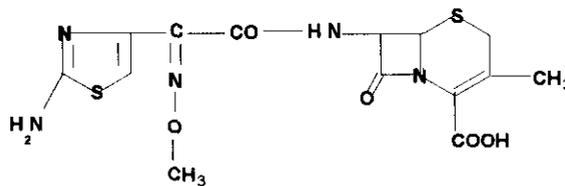
Su sal sódica es soluble en agua y sus propiedades farmacológicas favorables, su unión a las proteínas séricas, $t_{1/2}$ de 7,3 horas y, por tanto, el tiempo de eliminación, (47, 48) hacen posible su administración diaria en dos o tres dosis terapéuticas. Su metabolismo es renal (7, 49-51). Su vía de administración es parenteral. Se está estudiando la manera de aumentar su administrabilidad por vía oral, intentando esterificar el grupo carboxílico, produciendo así un precursor. Si no hay esterificación, no hay isomerismo, si se ataca con una base, se neutraliza el ácido carboxílico, con esta esterificación puede llegar a CH-acídico y la isomerización es posible. (52)

Además, consigue penetrar en importantes compartimentos corporales, tal como el cerebroespinal. La Ceftizoxima está indicada, por tanto, en infecciones abdominales, respiratorias y ginecológicas, así como en pediatría. Es efectiva cuando se ha creado resistencia a otras cefalosporinas (Cefalotina, Cefazolina y Cefamandola) y otros antibióticos como la Tobramicina y Ampicilina (53)

Una vez determinado su campo y mecanismo de acción y sus propiedades farmacológicas, abordaremos el campo químico.

La estructura general de las cefalosporinas consiste en un sistema de dos anillos, conocido como ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y sustituyentes en el radical 3 y en el carbono de la cadena lateral.

La Ceftrizoxima es un derivado acílico del ácido 7-aminocefalosporánico. Su nombre químico es el ácido (6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-amino-4-tiazolil)-2-metoxiiminoacetamido]-8-oxo-5-tia-1-aza-biciclo[4,2,0]oct-2-ene-2-carboxílico y su fórmula estructural es la siguiente:



Presenta dos características en su estructura química que la hacen notablemente diferente a las demás cefalosporinas. No presenta grupo sustituyente en la posición 3 del núcleo cefamo y tiene una oxima en su molécula (7). En virtud de la configuración geométrica del grupo metoximino la Ceftrizoxima es activa. Si la geometría es *sin* y además el isómero es *Z*, su potencia frente a los Gram positivos y negativos es de 10 a 50 veces mayor que el isómero anti y el *E*, tal como se muestra en la Tabla II. (3, 51,52, 54, 55).

Tabla II.- Actividad de los isómeros sin y anti de la Cefizoxima *in vitro*, medida en MIC (mg/mL).

Organismo	Sin(Z)	Anti(E)
Staph. aureus	1,6	25
E.coli	0,1	3,1
Ps. aureoginosa	>1,6	25
Pr. vulgaris	<0,025	1,6

Al igual que las penicilinas, las cefalosporinas sufren también una hidrólisis por acción de las bases análoga a la producida por las β -lactamasas. La ruptura del anillo β -lactámico es más compleja, puesto que se reestructura el anillo de dihidrotiacina. Por otra parte, el sustituyente 3-acetoximetilo, en las cefalosporinas, puede sufrir una metabolización en el organismo por la acción de las esterasas, para dar lugar al hidroxiderivado de menor actividad antibacteriana. Este a su vez, se transformará en una lactona prácticamente inactiva.

En contraste con las penicilinas, el grupo acílico del nitrógeno se elimina fácilmente cuando se abre el anillo β -lactámico.

La reactividad química de esta cadena lateral permite la creación de derivados estables frente a las esterasas. Por hidrogenación catalítica o empleando

reacciones de sustitución nucleofílica, tal como apreciamos en la figura 1, se consiguen estos derivados metabólicamente más estables. La sustitución nucleofílica con aminas, sulfuros o iones azida da lugar a los correspondientes derivados A, B y C. En el último caso la reducción de C conduce a aminoderivados susceptibles de nuevas derivaciones.

En condiciones básicas el doble enlace en posición Δ^3 de los ácidos cefalosporánicos, y más especialmente de sus ésteres, sufre una isomerización hacia derivados Δ^2 , que carecen de actividad antibacteriana, (figura 2). Esta reacción se debe tener en cuenta en la obtención de cefalosporinas de semisíntesis, ya que las reacciones de acilación del agrupamiento amino en posición 7 requieren generalmente la presencia de alguna amina terciaria. Afortunadamente, existe la posibilidad de transformar estos derivados inactivos en sus isómeros activos, por oxidación a Δ^3 sulfóxidos con perácidos seguida de reducción con, por ejemplo, tribromuro de fósforo.(2)

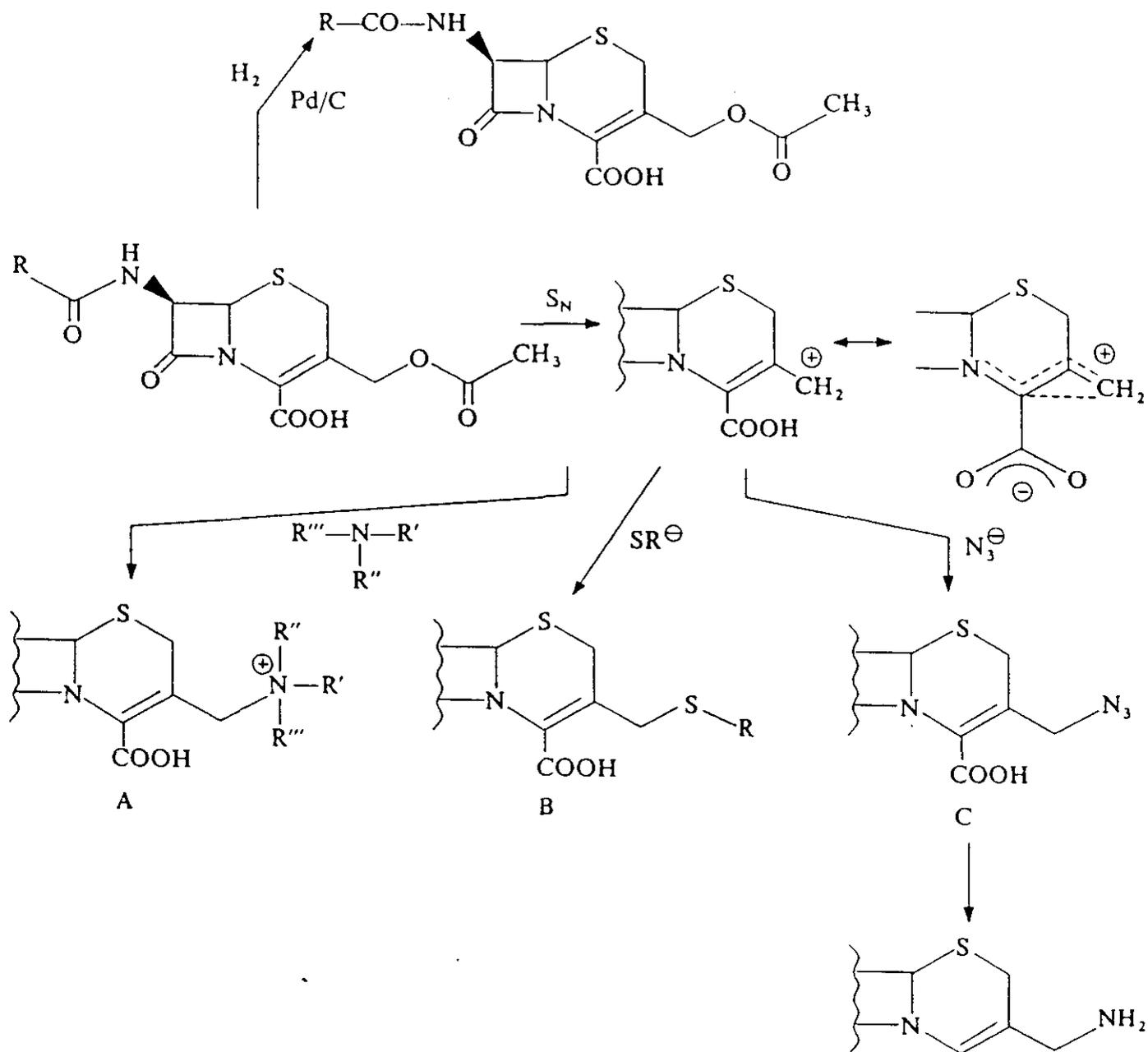


Figura 1.- Reactividad de la cadena lateral de cefalosporinas.

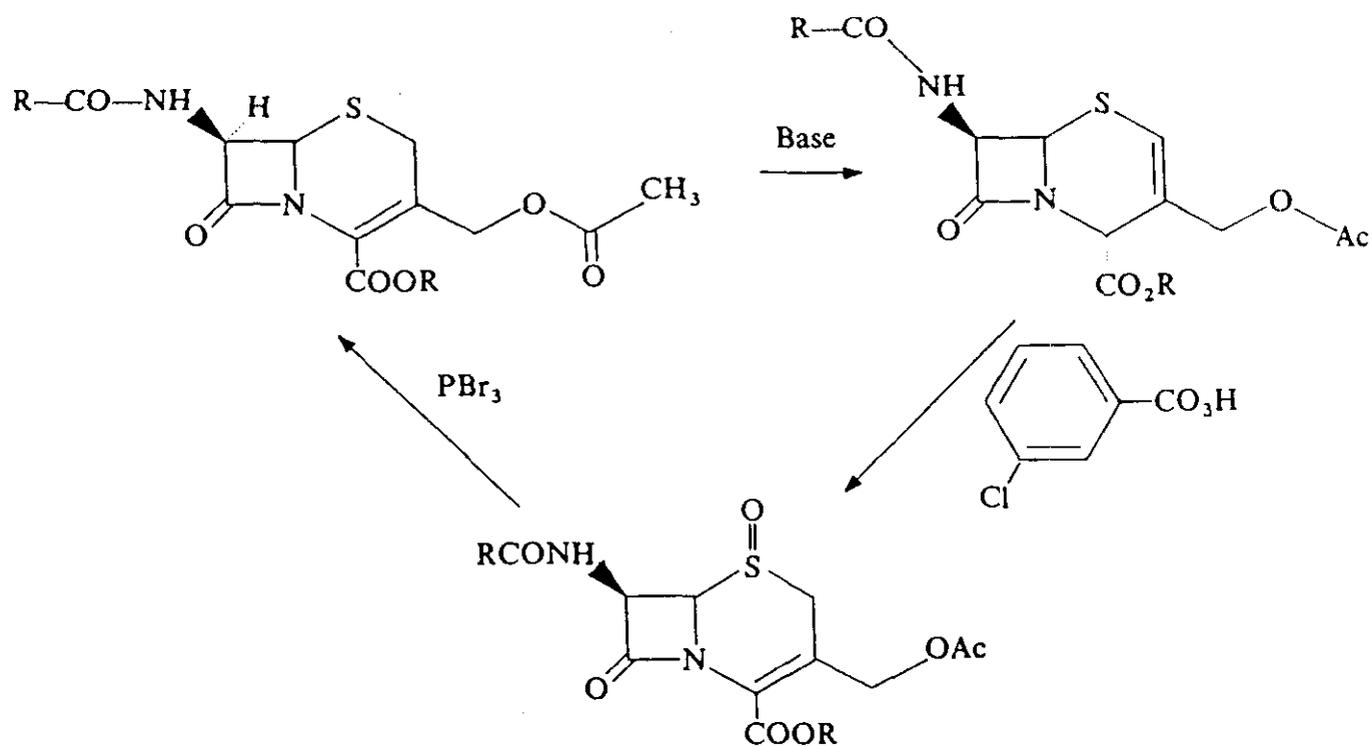


Figura 2.- Isomerización cefalosporinas.

RELACIONES ESTRUCTURA ACTIVIDAD

A la molécula de cefalosporina se le han hecho todas las combinaciones posibles para modificar su estructura. Sin embargo, de todas las cefalosporinas investigadas sólo contienen variaciones cuatro de todos los sitios posibles. En la cadena 7 acilamido, en el hidrógeno 7, en el anillo de azufre y en la posición 3. La resistencia a las β -lactamasa se relaciona con la estructura del núcleo cefamo más que con la del resto acilo, por lo que sus análogos por reacilación del 7-ACA y por desplazamiento o reducción del grupo acetoxilo se diseñaron para mejorar sus propiedades farmacocinéticas fundamentalmente y también para lograr una mejor actividad antibacteriana.(2,3, 56-59)

La presencia del azufre en el anillo β -lactámico es inalterable, puesto que está relacionado con la potencia antibacteriana.

La variación en el grupo 7 acilo influye en el carácter hidrofílico/hidrofóbico de los diferentes compuestos y por tanto, en su espectro de acción. La constante de disociación, pKa del grupo carboxílico (C4) está entre 1.7 y 2.6. Esta constante indica una fuerte acidez en el grupo carboxílico por la presencia de grupos electronegativos adyacentes. Sin embargo, el nitrógeno del anillo β -lactama tiene débiles propiedades básicas. El grupo α -amino presente en varias cadenas acilamido posee un pKa entre 7 y 7.4.

El hidrógeno 7 tampoco se puede sustituir, influye en la estabilidad frente a las β -lactamasas.

El efecto de los sustituyentes en la geometría de la oxima, se ha comentado anteriormente. Cualquier cambio estructural, por pequeño que sea, influye profundamente en la actividad bacteriana. Es el isómero *sin* el efectivo y el que *presenta interés clínico*. Recientes investigaciones atribuyen que la diferencia en la potencia de estos dos isómeros es debida a la escasa afinidad de los isómeros *anti* por las enzimas diana.

La naturaleza del grupo próximo al oxígeno de la oxima da el grado de la actividad, pero con efectos mínimos. Conforme se incrementa la longitud del grupo alquílico, decrece la eficacia contra los Gram negativos y si aumentamos dicha cadena y además colocamos en el extremo un grupo polar, la actividad disminuye contra los Gram positivos. En consecuencia, un grupo metílico da un óptimo balance contra los Gram negativos y positivos.

Si presenta una función ácida el oxígeno de la oxima se producen derivados que son efectivos frente a las *Pseudomonas*, y por contra, se reduce sustancialmente su actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

La variación en el tercer sustituyente parece que no presenta grandes cambios en el comportamiento del espectro de acción, que sea un acetoximetilo o un tiometilheterocíclico o como en el caso de la Ceftizoxima un hidrógeno no lo modifica. Diversos estudios indican que la naturaleza del tercer sustituyente afecta

a las propiedades farmacocinéticas de las cefalosporinas. La incorporación de una función ácida en un sustituyente heterocíclico aumenta los niveles de la cefalosporina en sangre y aumenta la semivida de esa cefalosporina.

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN ANALÍTICA

Las cefalosporinas se determinan, generalmente, por técnicas microbiológicas o bien por HPLC. Como se ha subrayado en múltiples ocasiones, la principal desventaja de estos procedimientos biológicos cuando se realizan estudios de estabilidad, es que no son capaces de distinguir entre sus productos de degradación, agravado este problema si son, además, productos con actividad microbiana, por otra parte, es difícil eludir la contaminación de cultivos. (60)

Otras técnicas analíticas, se emplean para la identificación de las cefalosporinas, si bien, no son apropiadas para estudios de estabilidad.

El espectro de IR se ha registrado y comparado con el material de referencia. Para ello, se emplea la cefalosporina en polvo y se hace una pastilla con bromuro potásico. Se observa una vibración en una banda de $1770-1790\text{ cm}^{-1}$ indicativa del grupo β -lactamacarbonilo. Cambios en esta región son indicativos de la apertura del anillo lactama, y aparecen bandas a menores longitudes de onda. También se puede apreciar en el espectro IR si ha habido oxidación del azufre a sulfóxidos (52).

Al mismo tiempo, las bandas de β -lactamacarbonilo informan de la reactividad del mismo. El anillo β -Lactama posee una banda a 1750 cm^{-1} . Lactamas o amidas ácidas absorben a menores frecuencias, entre 1730 a 1670 cm^{-1} , ya que, en el nitrógeno hay un par de electrones libre, que puede formar con el grupo carbonilo un isómero resonante.

Si esta resonancia es estéricamente inhibida, se produce aumento en la longitud de onda de las bandas del IR, significativas de mayor reactividad del grupo carbonilo frente a elementos nucleofílicos, al no poder compensar ese par de electrones.

Siguiendo en la línea de técnicas espectrométricas,(52, 61-67) se ha estudiado su comportamiento en la zona ultravioleta. Presenta dos máximos de absorción a 240 y 260 nm. El máximo a 240 nm es asignado principalmente al radical tienilo. Si el anillo se abre la banda de 260 nm desaparece, se remplaza por una nueva banda a 230 nm y a su vez desaparece al cabo de varias horas por desintegración de la molécula. La causa aparente de la desaparición de la banda de 260 nm es el isomerismo del doble enlace que ocurre cuando se rompe el anillo y se elimina la cadena lateral. Esta técnica se emplea como test de pureza, ya que se establece la relación entre uno y otro máximo. El factor de proporcionalidad aumenta conforme se va degradando la molécula, y a su vez la extinción a 255 nm disminuye. Este valor no debe exceder de 1,10 para estar dentro de las normas de la Farmacopea Europea.

La técnica de cromatografía en capa fina (68-69), no es la más apropiada, aunque sea más rápida que las microbiológicas y es un método válido para la Farmacopea.

Igualmente ocurre con métodos iodométricos, que son efectivos una vez que se ha roto el anillo (70-73).

La determinación colorimétrica de las penicilinas y cefalosporinas (74-75), hasta hace poco descrita en la U.S.P., no identificaba el anillo β -lactámico, sino las cadenas laterales de cada cefalosporina. Para ello, se las hacía reaccionar con hidroxilamina férrica (58).

Otro método general de determinación de cefalosporinas es por la detección electroquímica indirecta, usando la medida comparativa de consumo de bromuro. La reactividad de las cefalosporinas con el bromuro es por la estructura básica β -lactama, también es interesante destacar la facilidad de oxidación de la cadena de aminotiazol (76-79).

El método de elección es la técnica de HPLC (80-92) y empleando como detección la absorción ultravioleta. La ventaja de esta técnica radica en la buena y selectiva separación de la fase reversa y su sensibilidad a la absorción ultravioleta que permite distinguir entre varias cefalosporinas, en estudios precisos de investigación farmacocinéticas, y sus productos de degradación simultáneamente. Además, en muchas formulaciones, los excipientes no interfieren en el análisis. Otra de las ventajas de la HPLC es su ilimitado potencial, permite analizar principios activos de diferentes características, peso molecular, etc, cambiando sus módulos. Es una técnica de análisis, relativamente rápida y una vez establecido el método de análisis para un antibiótico, se puede acoplar para toda la familia de dicho antibiótico, variando, generalmente, la composición de la fase móvil.

ANTECEDENTES

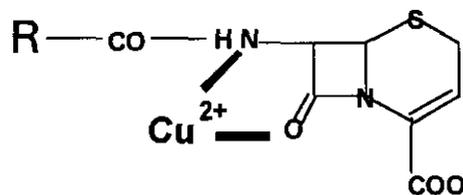
INTERACCIÓN DE METALES CON ANTIBIÓTICOS

Es conocido que ciertos iones de metales de transición, ejercen un efecto catalítico en la reacción de hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos, de los que es ejemplo típico el ión Cu (II) (93).

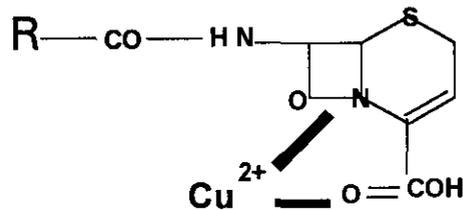
En efecto, hay estudios clínicos realizados en pacientes, que demuestran un descenso moderado en la concentración de Ampicilina, después de la inserción de un DIU-Cu.

La unión entre el Metal y el antibiótico, va a constituir un anillo quelato, donde la molécula del ligando, va a actuar con enlace bidentado.

El enlace del ligando con el Metal, se va a establecer mediante átomos donadores de Oxígeno y Nitrógeno, siendo posible, dos tipos de uniones, ya que el Metal, se puede quelatar con el N de la cadena lateral y el O del enlace ceto del anillo β -lactámico; tal como se muestra en la siguiente figura:

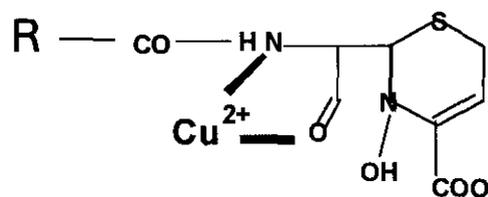


O bien, entre el N del anillo β -lactámico y el Oxígeno del grupo carboxílico:

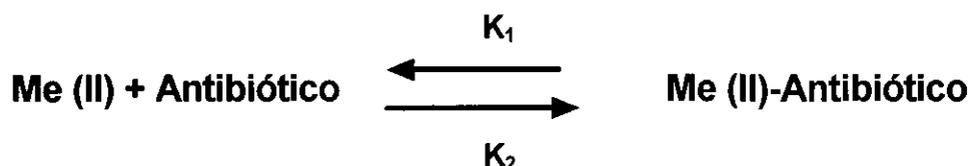


En ambos casos, se forma un anillo quelato de 5 miembros, pero sólo con el primer tipo de unión, es posible una acción catalítica por parte del ion metálico, que conduzca a la hidrólisis del antibiótico, por ruptura del anillo β -lactama. En el segundo tipo de unión, entre el N del anillo β -lactama y el O carboxílico, no tiene acción catalítica el metal sobre el anillo β -lactama.

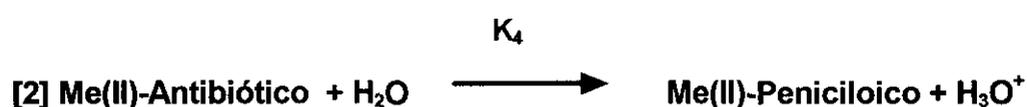
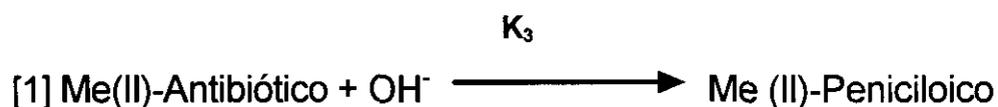
Cuando se produce, la ruptura hidrolítica del anillo β -lactama en el complejo antibiótico-Metal, el metal no se desliga de sus puntos de unión con el ligando, sino que lo que ocurre, es la formación de un nuevo complejo con el derivado peniciloico del antibiótico, de tal manera que el anillo quelato, sigue siendo de 5 miembros:



Por tanto, en el mecanismo de reacción, nos vamos a encontrar con dos fases; una primera de formación del complejo, según la reacción de equilibrio:



Y otra, de hidrólisis del complejo formado entre el antibiótico y el Me. Esta última reacción puede ser catalizada por el ión OH^- o por la molécula de H_2O . Con el H_2O es espontánea; de tal manera, que tendríamos dos reacciones de hidrólisis, con dos constantes:



Weiss, Fallab y Erlenmeyer (94), son los primeros autores, que estudian las propiedades complejantes de la Penicilina G con el ion Cu^{2+} , determinando un valor para la constante de formación del complejo, $\log \beta$, de 4,8. Posteriormente, Niedergall y col. (95), estudian con más detalle, la complejación de las Penicilinas G y V, con los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} , los cuales, utilizando técnicas

potenciométricas, llegan a la conclusión que sólo los iones Cu^{2+} y el Zn^{2+} , forman complejos con las penicilinas.

Cressman y col. (96), determinan las constantes de estabilidad de los complejos de Cu^{2+} con las Penicilinas G y V y con la bencil-penicilina y fenoximetilpenicilina, empleando también métodos potenciométricos.

Por otra parte, en nuestro Departamento, se aborda el estudio de la reacción de complejación de la Ampicilina(97) y Metampicilina(98) con el ion Cu^{2+} , por técnicas espectrofotométricas, encontrando que el complejo formado, es coloreado, con un máximo de absorción a 323 nm, y cuya estequiometría es 1:1.

Las técnicas empleadas en estos trabajos, espectrofotométricas y potenciométricas, no permiten separar el antibiótico, de sus productos de hidrólisis,

En dos Tesis Doctorales realizadas posteriormente en nuestro Departamento (99.100), se efectuó el estudio de la interacción de la Amoxicilina y de la Ampicilina con Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y VO^{2+} , empleando modernas técnicas separativas por HPLC y llegando a la conclusión de que solamente el ion Cu^{2+} y el VO^{2+} , son capaces de formar complejo, que es además de tipo hidrolítico, con esos antibióticos, no manifestando los demás iones estudiados efecto catalítico alguno(101).

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS

Patrones y Reactivos

Se ha empleado un patrón de Cefprozil sódica suministrada por los laboratorios SKF, de una riqueza del 99,7 %, por el método iodométrico, según boletín de análisis, a una concentración de 0,5 mg/mL. Así mismo, se ha utilizado 7-ADCA patrón suministrado por SKF, para intentar identificar uno de los productos de hidrólisis de la Cefprozil, a una concentración de 1 mg/mL.

En el estudio de la interacción de los iones metálicos con la Cefprozil, se han preparado disoluciones de dichos iones, a partir de los siguientes productos:

- Sulfato de Cobre pentahidratado.
- Sulfato de Vanadilo pentahidratado.
- Sulfato de Níquel hexahidratado.

Todos estos reactivos son de calidad analítica Merck.

El agua empleada en los ensayos cromatográficos fue obtenida por la técnica Milli-Q (Millipore), y después filtrada por filtros Millipore de 0,45 μm .

El Metanol utilizado en la técnica cromatográfica fue de calidad para análisis HPLC de Scharlau.

Soluciones Tampones

Para los ensayos cromatográficos, hemos utilizado soluciones tampones preparadas, según el método de Sørensen, con valores de pH de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

La preparación de estas soluciones, se han realizado a partir de los siguientes reactivos:

- ❶.- NaOH: Hidróxido sódico 0,1 M para análisis Merck.
- ❷.- HCl: Ácido Clorhídrico 0,1 M para análisis Merck.
- ❸.- Citrato: 21,04 g de ácido cítrico para análisis Merck, disueltos en agua, mezclados con 200 mL de NaOH 1N, se completan con agua hasta 1 L.
- ❹.- Fosfato Na: 11,866 g de fosfato disódico dihidratado para análisis Merck, se completan con agua hasta 1 L.
- ❺.- Fosfato K: 9,07 g de fosfato monopotásico anhidro para análisis Merck, se completan con agua hasta 1 L.

Los reactivos se mezclan, para obtener el pH adecuado, según la siguiente tabla:

pH	Reactivo 1	Reactivo 2
2	30,6 mL Citrato	69,4 mL HCl
3	40,3 mL Citrato	59,7 mL HCl
4	56,0 mL Citrato	44,0 mL HCl
5	96,4 mL Citrato	3,6 mL NaOH
6	12,1 mL Fosfato Na	87,9 mL Fosfato K
7	61,2 mL Fosfato Na	38,8 mL Fosfato K
8	94,5 mL Fosfato Na	5,5 mL Fosfato K

Las soluciones tampones se mantienen a una constante iónica de 0,5 M, por adición de las cantidades apropiadas de Cloruro potásico. Una vez preparadas, se filtran por filtros Millipore de 0,2 μm y se conservan en nevera.

Para la preparación de la fase móvil en el método cromatográfico en fase reversa, se utilizó una solución tampón de fosfato, preparada de la siguiente forma:

1,361 g de fosfato monopotásico anhidro calidad para análisis Merck, se disuelven en agua, enrasando a 1 L, añadiendo posteriormente ácido o-fosfórico hasta pH 2,5. Esta disolución se filtra a través de filtros Millipore de 0,2 μm y se conserva en nevera hasta su utilización.

Instrumentación

Cromatografía de líquidos en fase reversa

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos, compuesto por los siguientes módulos:

Bombas cromatográficas

Se han usado dos bombas Waters modelos M-6000A, con posibilidades de flujos de 0,1 a 10 mL/min. El flujo se fijó a 0,9 mL/min. Las bombas son controladas por el ordenador, mediante una tarjeta multicontrol y una interfase Waters.

Inyección

Se ha utilizado un inyector automático Kontron Auto Sampler 460, impulsado por aire comprimido, con carro para 100 muestras, jeringa de 80 μ L y modulo opcional térmico, que permite mantener una temperatura constante, a partir de la suministrada por un baño de agua o aceite externo o un dedo frío. En nuestro caso, hemos empleado un baño de agua termostatzado SBS, a las temperaturas de nuestro ensayo. El volumen de inyección se fijó a 10 μ L. El inyector se controla desde el ordenador, mediante una conexión RS232C.

Detección

Se han empleado dos detectores simultáneamente: Uno de ellos, es un detector Kontron Uvikon 730 LC, de longitud de onda variable de 600-190 nm.,

conectado al ordenador mediante una tarjeta digital analógica que permite la integración de los picos cromatográficos, pero no la realización de los espectros U.V. de ellos y, un detector de Diodos LDC SM 5000, que permite trabajar a longitudes de onda entre 390 y 190 nm., realizando el espectro U.V. en cada uno de los picos cromatográficos, aunque con el software utilizado (SM 5000 v.1,05) no es posible la integración de los cromatogramas. La longitud de onda se fijó en ambos a 254 nm, aunque el detector de diodos empleado permite un barrido simultáneo de hasta 8 longitudes de onda, lo que no empleamos, puesto que el software nos da información de cualquier longitud de onda que seleccionemos, una vez concluido el análisis.

Columna

La columna utilizada fue una Li-Chrosorb RP-18 de 10 μ m (25x0,46 cm) suministrada por Merck, con un número de platos teóricos por metro de 80.000.

Tratamiento de Datos

Se ha conectado al sistema cromatográfico dos estaciones de tratamiento de datos: La primera compuesta por un ordenador personal Amstrad AT-286 con conexión al detector de diodos, mediante una interfase RS232C y software SM 5000 v. 1,05, que permite la obtención del cromatograma y de los espectros U.V. de los picos cromatográficos de una forma simultánea, pudiendo elegir la longitud de onda que se prefiera, pero que no permite la integración de los picos cromatográficos y por tanto no se pueden cuantificar los resultados. Con este paquete de software se pueden realizar dos tipos de análisis de pureza de picos, bien utilizando la 1ª o 2ª derivada, como en cualquier espectrofotómetro

convencional, o mediante el llamado Ratio, donde el programa efectúa una comparación de dos o más cromatogramas, en dos longitudes de onda diferentes, mostrando los resultados en forma de una gráfica de hombros, donde la pureza se determina midiendo la mayor o menor linealidad de ellos. La segunda estación, está compuesta por un ordenador personal PC compatible AT a 10 MHz, con conexiones al inyector automático, a las bombas y al detector Kontron, controlados mediante el software D450 v. 2,0 de Kontron y que permite la integración de los picos cromatográficos y por tanto es el que empleamos para la cuantificación de los resultados.

Fase móvil

Se ha empleado una fase móvil compuesta por Metanol y tampón fosfato preparado según se ha descrito con una composición de 30:70. Los disolventes se desgasifican empleando una corriente de Helio.

Cromatografía iónica

Para la determinación de la concentración de Cu(II) y VO²⁺ residual, que no forman complejo, hemos utilizado un sistema cromatográfico compuesto por una bomba Waters M 510, un detector conductimétrico Waters 430 y un inyector manual Waters U6K de 100 µL. El tratamiento de datos se ha efectuado con el programa D450 de Kontron.

La columna utilizada fue una Ion 210, suministrada por Waters Associated y la fase móvil está compuesta por ácido cítrico 10 mM y EDA 3,5 mM. El flujo fue de 2 mL/min.

Se utilizaron patrones de sulfato de cobre y sulfato de vanadilo pentahidratados Merck a una concentración de 0,002 mM, expresada en ion metálico.

pHmetro

Se ha utilizado un pHmetro Methrom-Herisau E 520, para el ajuste de las soluciones tampones.

Balanza

Hemos empleado una balanza Sartorius analítica con 4 cifras decimales.

ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS

En este tipo de ensayos hidrolíticos, es necesario mantener constantes todas las variables, excepto una; por ello hemos estudiado la influencia en la variación del pH del tampón, temperatura y concentración de los iones metálicos que forman complejo, en las correspondientes reacciones de hidrólisis. En todas las reacciones se ha mantenido siempre constante la fuerza iónica del tampón, ya que su influencia es mínima.

Influencia del pH

La reacción de hidrólisis de la Cefprozil, se ha estudiado en los valores de pH= 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, mientras que las correspondientes a la hidrólisis del complejo Cefprozil-Mg, se han realizado a pH= 2, 3, 4 y 5, ya que con valores de pH=6 o superiores, se forman hidroxocomplejos, que precipitan e imposibilitan su cuantificación por HPLC. En el caso de la adición de Ni, que no produce complejo, es posible también su estudio en los valores de pH 2 a 8.

Influencia de la Temperatura

En todos los ensayos hemos operado a temperaturas de 30, 40, 50 y 60 °C.

Influencia de la concentración del ion metálico

Se ha estudiado la influencia de la concentración del metal, en cuatro relaciones molares Me/Ceftizoxima: 0,5:1, 1:1, 2:1 y 3:1. En el caso del Ni, solo hemos utilizado la relación 1:1, ya que al no formar complejo, la influencia de este factor es inapreciable.

La concentración de Ceftizoxima se mantiene siempre constante a 1,26 mM., calculada en base anhidra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MECANISMO DE LAS REACCIONES

Para estudiar las correspondientes reacciones hidrolíticas, se hace necesario primero, el establecer el mecanismo de reacción de ellas, ya que de ello depende la aplicación de distintas constantes de hidrólisis.

Este estudio es posible realizarlo, a partir de los resultados obtenidos con nuestra técnica de HPLC, en los distintos cromatogramas, tal como mostramos a continuación.

El tratamiento informático, se ha realizado en este apartado con el programa SM5000.

Ceftizoxima

El cromatograma obtenido en el ensayo de la Ceftizoxima, a tiempo inicial, pH=5 y T=30°C, se muestra en la figura 1, donde se manifiestan dos picos cromatográficos. El pico I, tiene un tiempo de retención de 1,43 min. y el pico II de 1,66 min. En la figura 2, se muestra el isograma de concentraciones, donde se aprecia que no existen mas picos que los comentados.

El análisis de pureza de estos picos cromatográficos, se ha efectuado por representación de la segunda derivada, tal como se muestra en la figura 3 y por análisis del Ratio, a 260 y 310 nm, tal como vemos en la figura 4. En ambas representaciones, se puede apreciar que los picos son puros, con una sola absorción en la 2ª derivada y un hombro plano en el de relaciones entre longitudes de onda o Ratio.

Los dos picos cromatográficos, presentan idéntico espectro de absorción U.V., con máximos a 280, 240 y 201 nm, tal como se muestran en las figuras 5 y 6, y disminuyen con el tiempo de hidrólisis, por lo que debe de tratarse de dos isómeros de la Ceftizoxima.

A partir de 2 horas de degradación, en las mismas condiciones, se observa en el cromatograma, la aparición de un tercer pico cromatográfico; el pico III de tiempo de retención 1,15 min., tal como se muestra en la figura 7. El análisis de las relaciones entre las longitudes de onda a 260 y 310 nm, nos manifiesta también en este caso una gran pureza de aquellos, ya que los hombros obtenidos son muy planos, tal como se muestra en la figura 8. El espectro U.V. del pico III, presenta tres máximos a 279, 239 y 191 nm, tal como se puede apreciar en la figura 9, y

254 nm

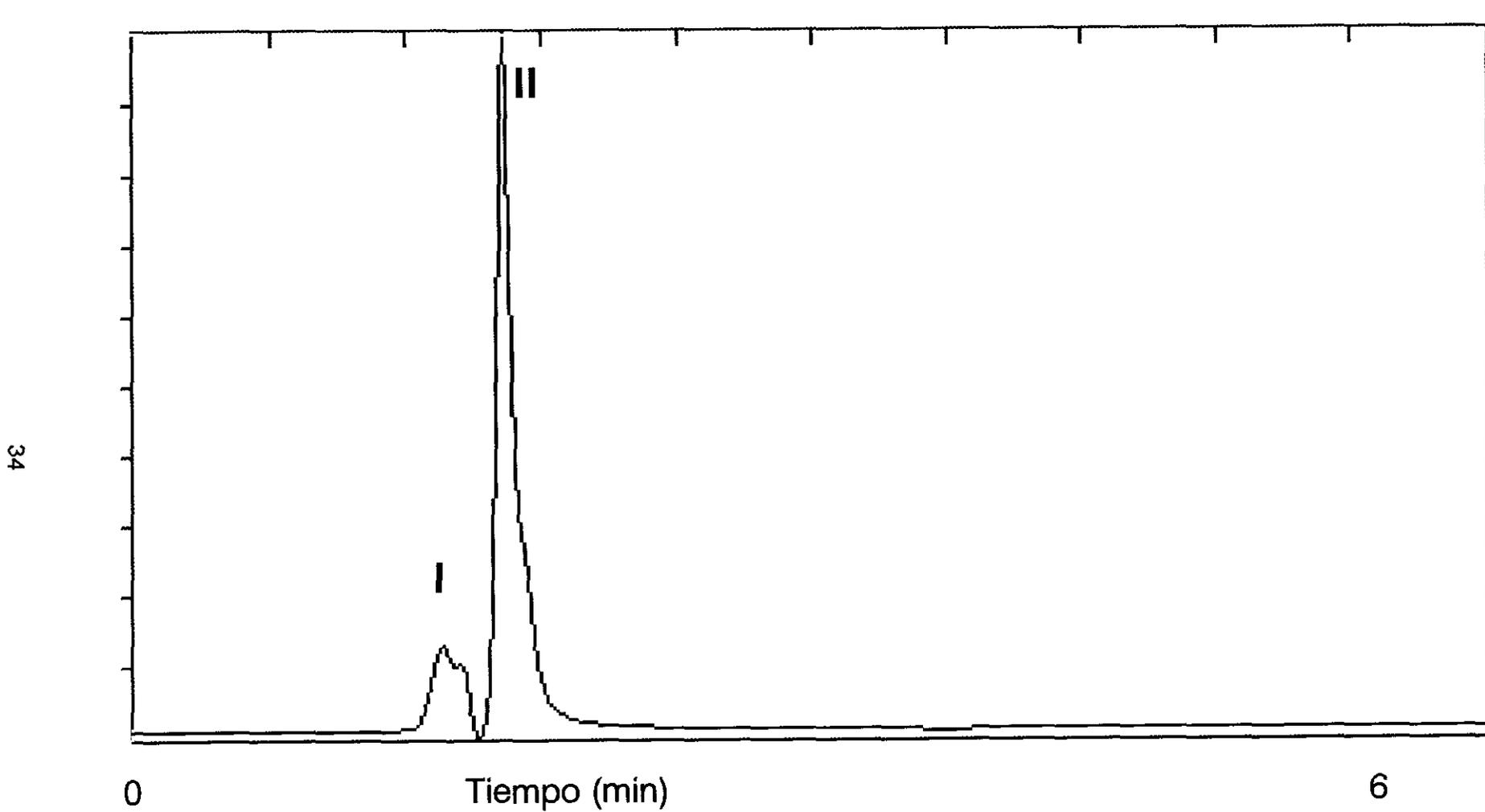


Figura 1.- Cromatograma de la Cefprozil a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$, a tiempo inicial.
I. $t_r=1,43\text{ min}$. II. $t_r=1,66\text{ min}$.

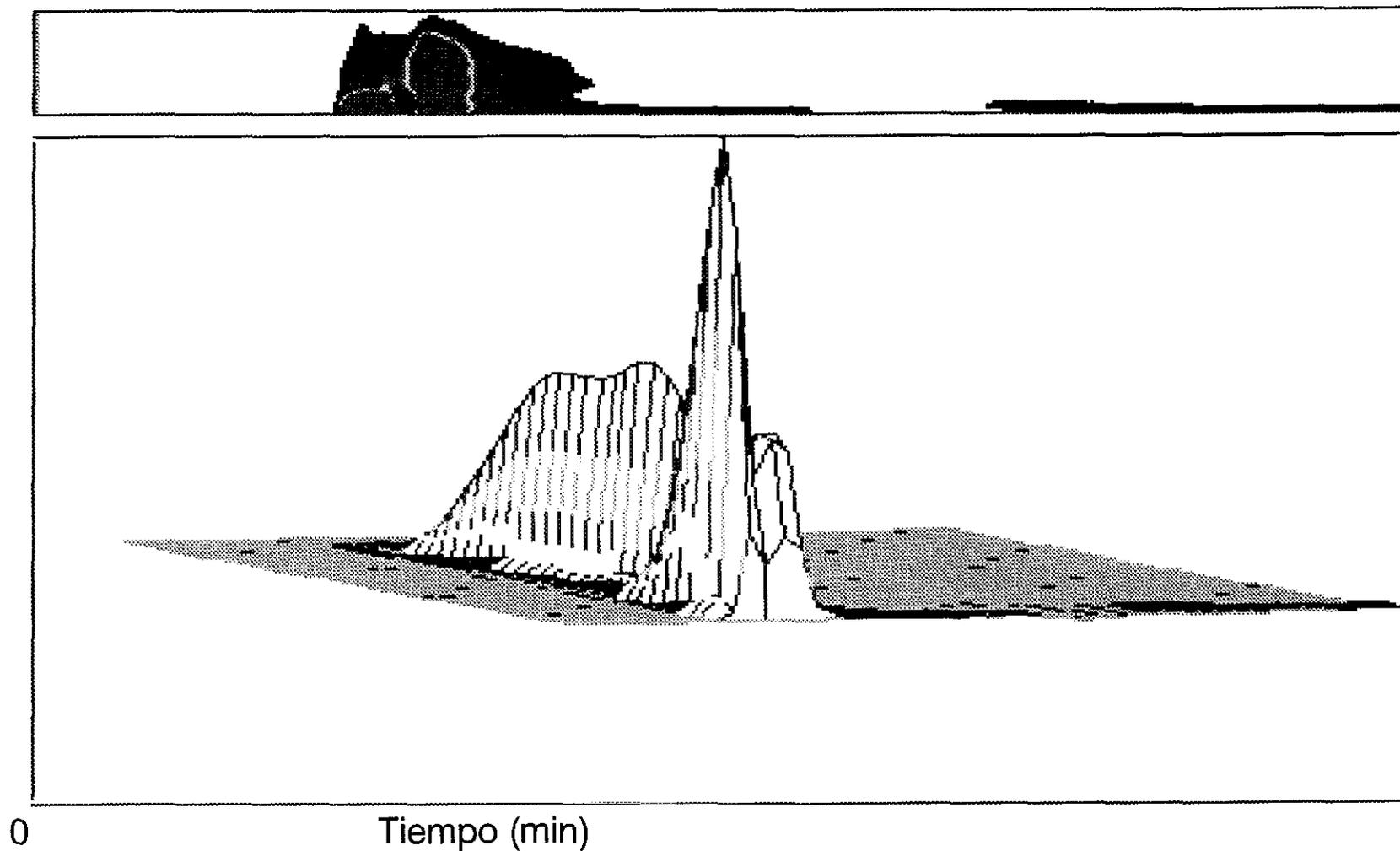


Figura 2.- Isograma de la Cefprozil en condiciones iniciales. $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5$. Longitud de onda= 254 nm .

254 nm

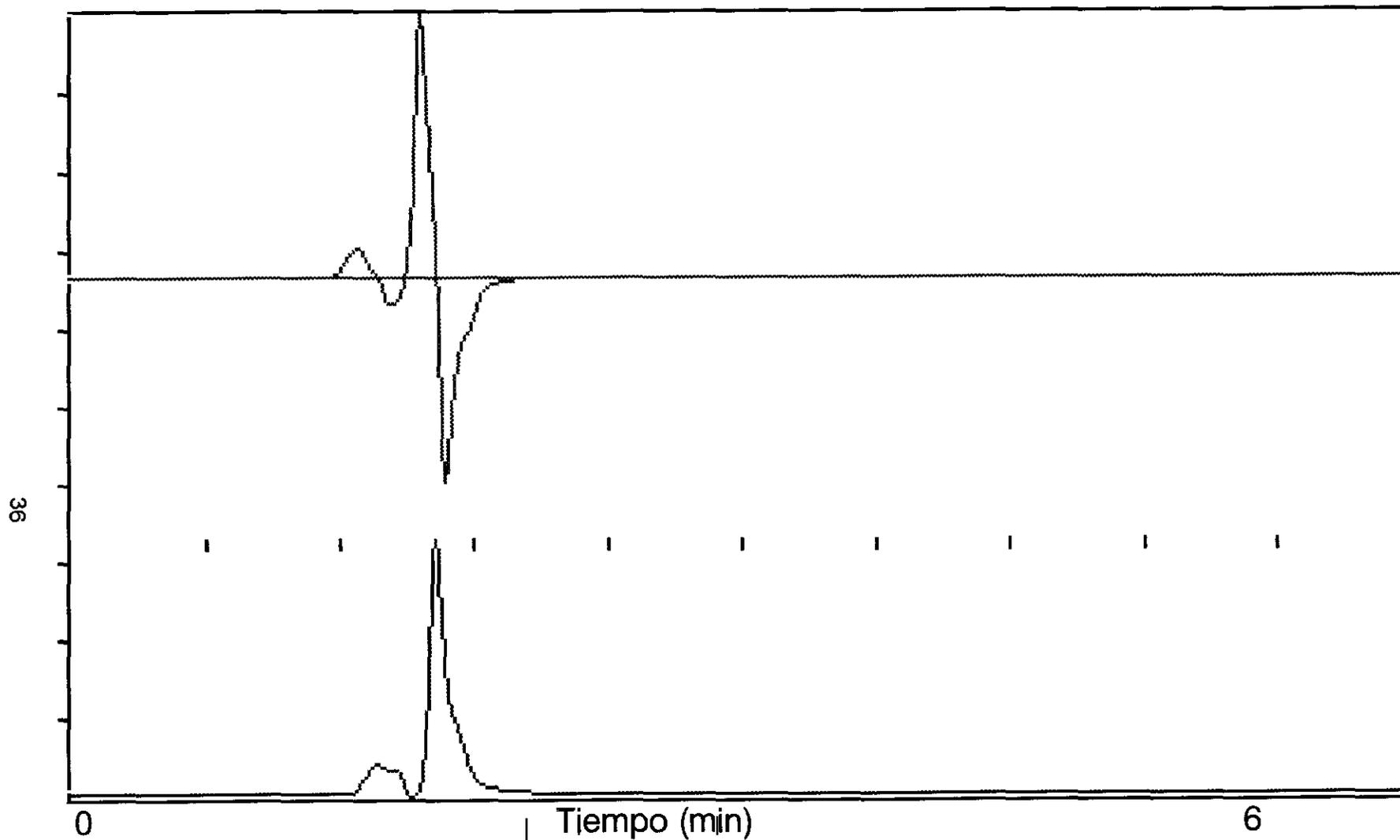


Figura 3.- Representación de la 2ª Derivada de la Cefprozil en condiciones iniciales. T=30 °C y pH=5.

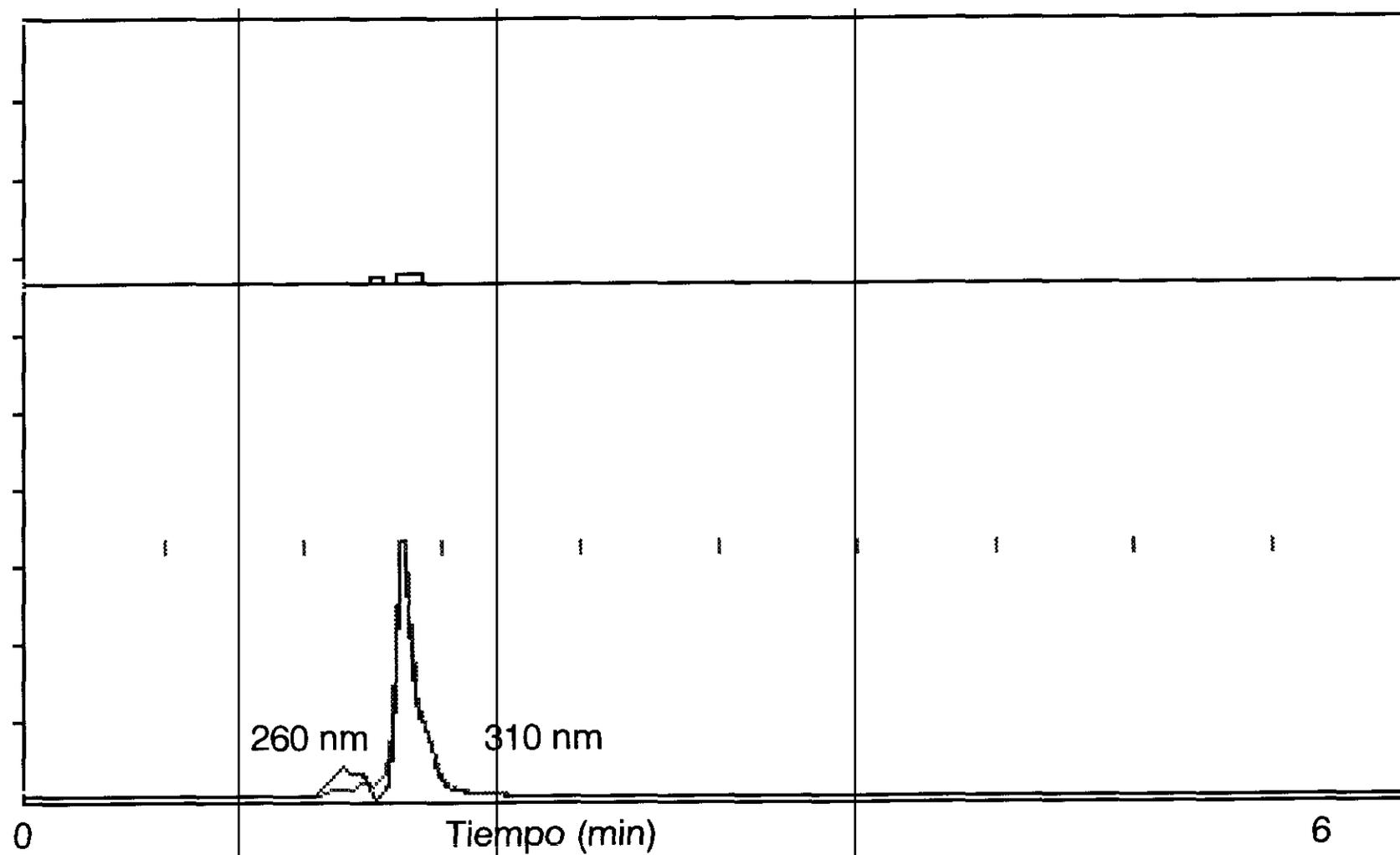


Figura 4.- Análisis del Ratio de la Cefprozil en condiciones iniciales. $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

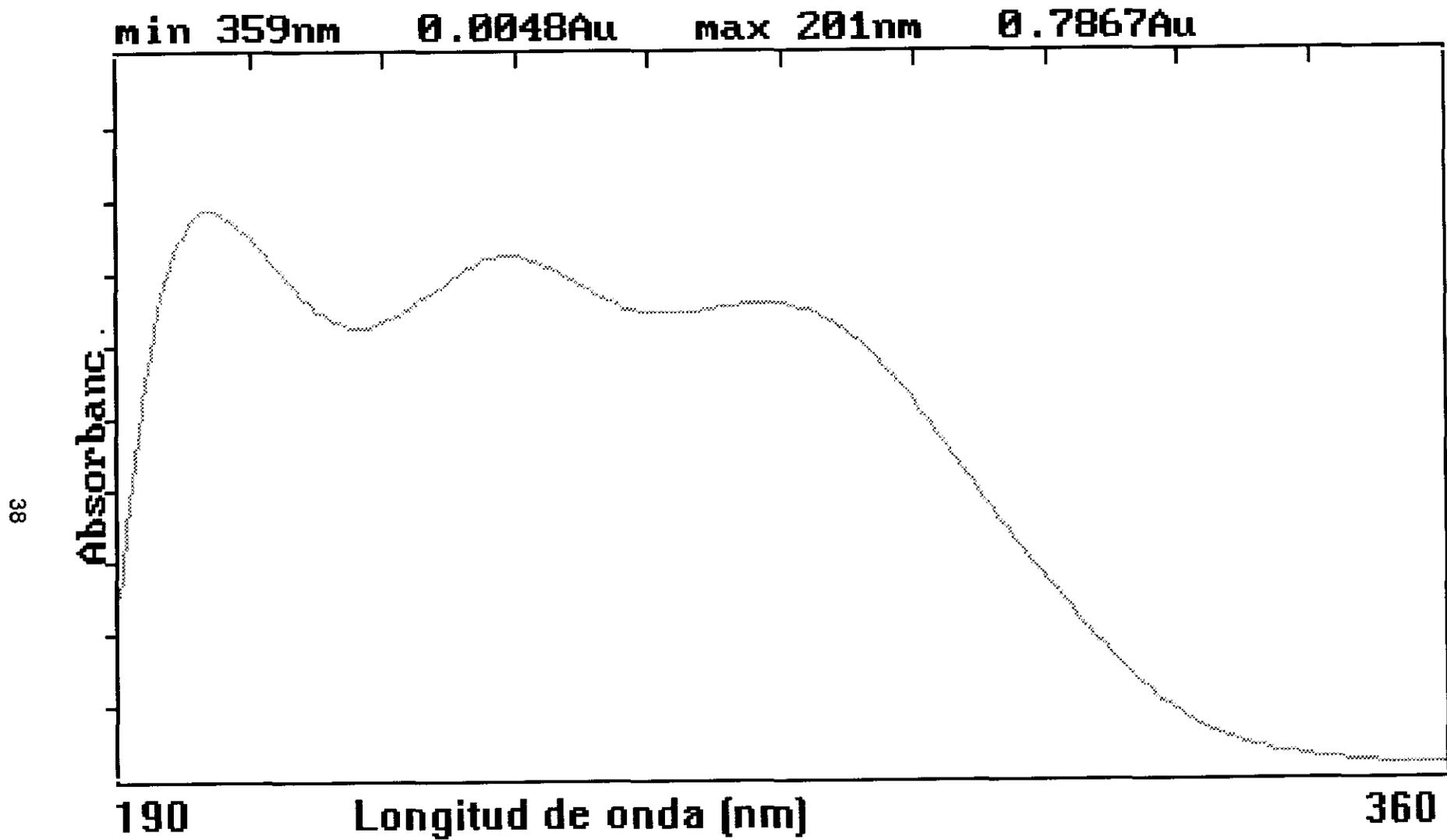


Figura 5.- Espectro U.V. del pico de $t_r=1,66$ min. $T=30$ °C y $pH=5$.

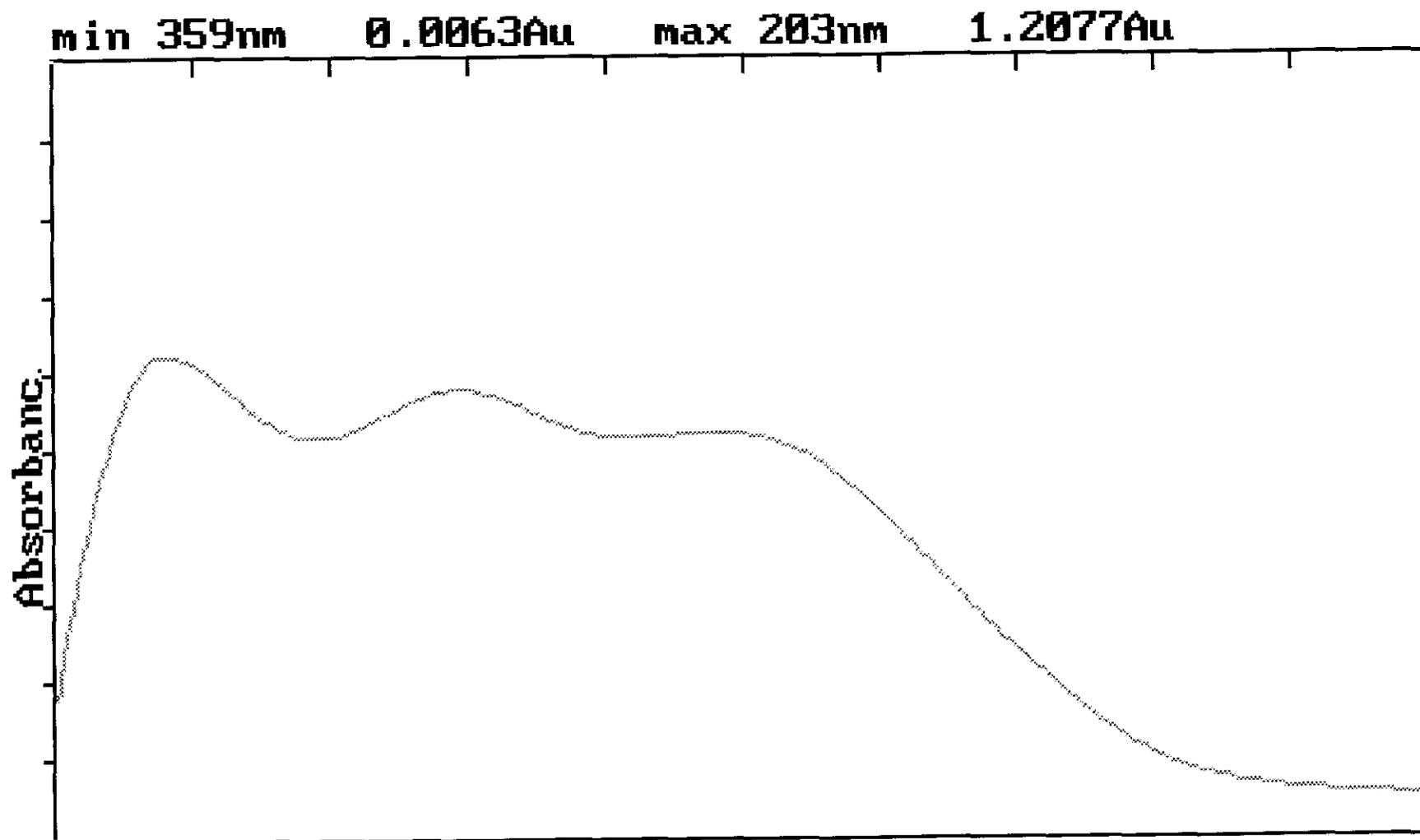


Figura 6.- Espectro U.V. del pico de $t_r=1,43$ min. $T=30$ °C y $pH=5$.

254 nm

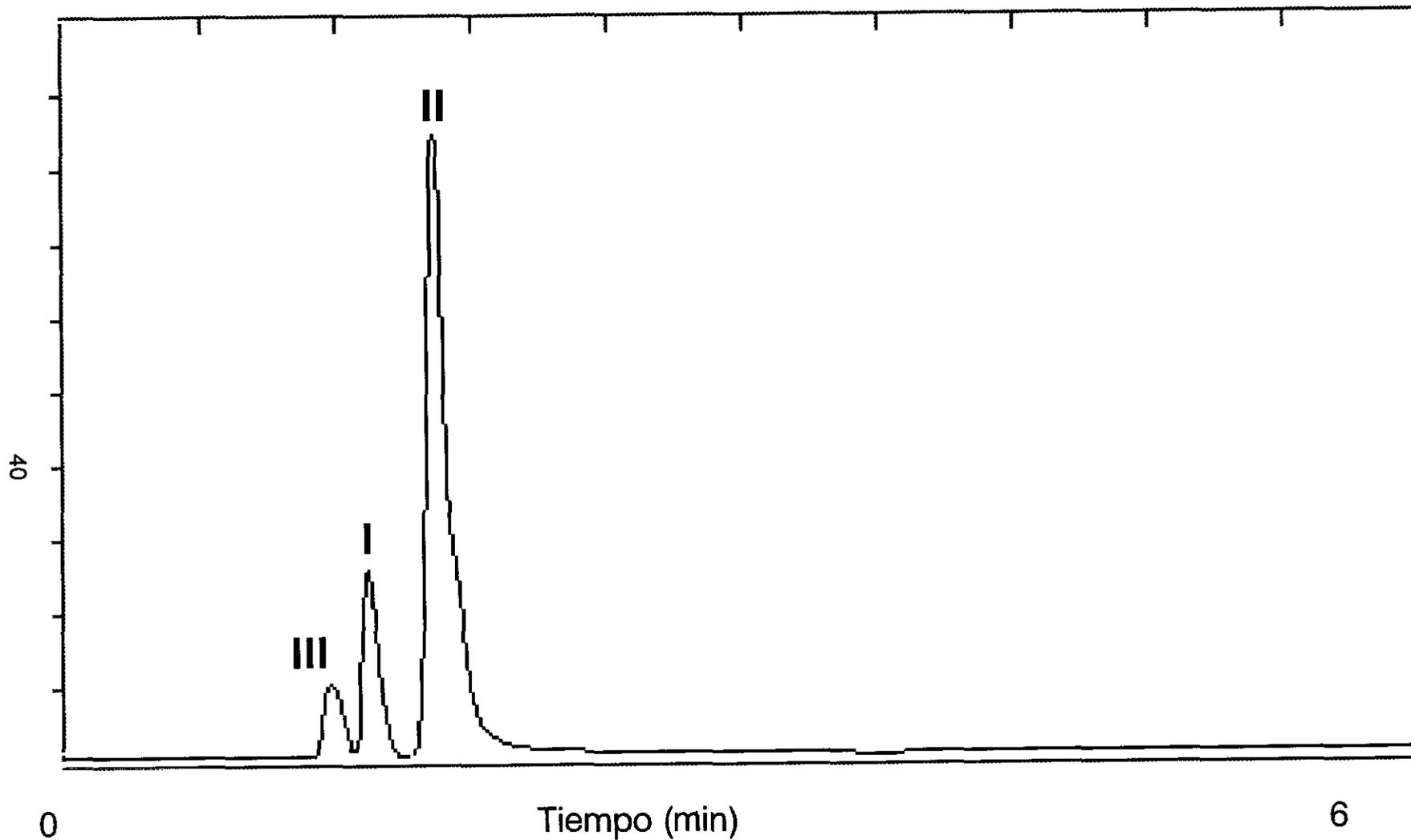


Figura 7.- Cromatograma de la Cefprozil a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$, degradada 2h.

I. $\text{tr}=1,43\text{ min}$. II. $\text{tr}=1,66\text{ min}$. III. $\text{tr}=1,15\text{ min}$.

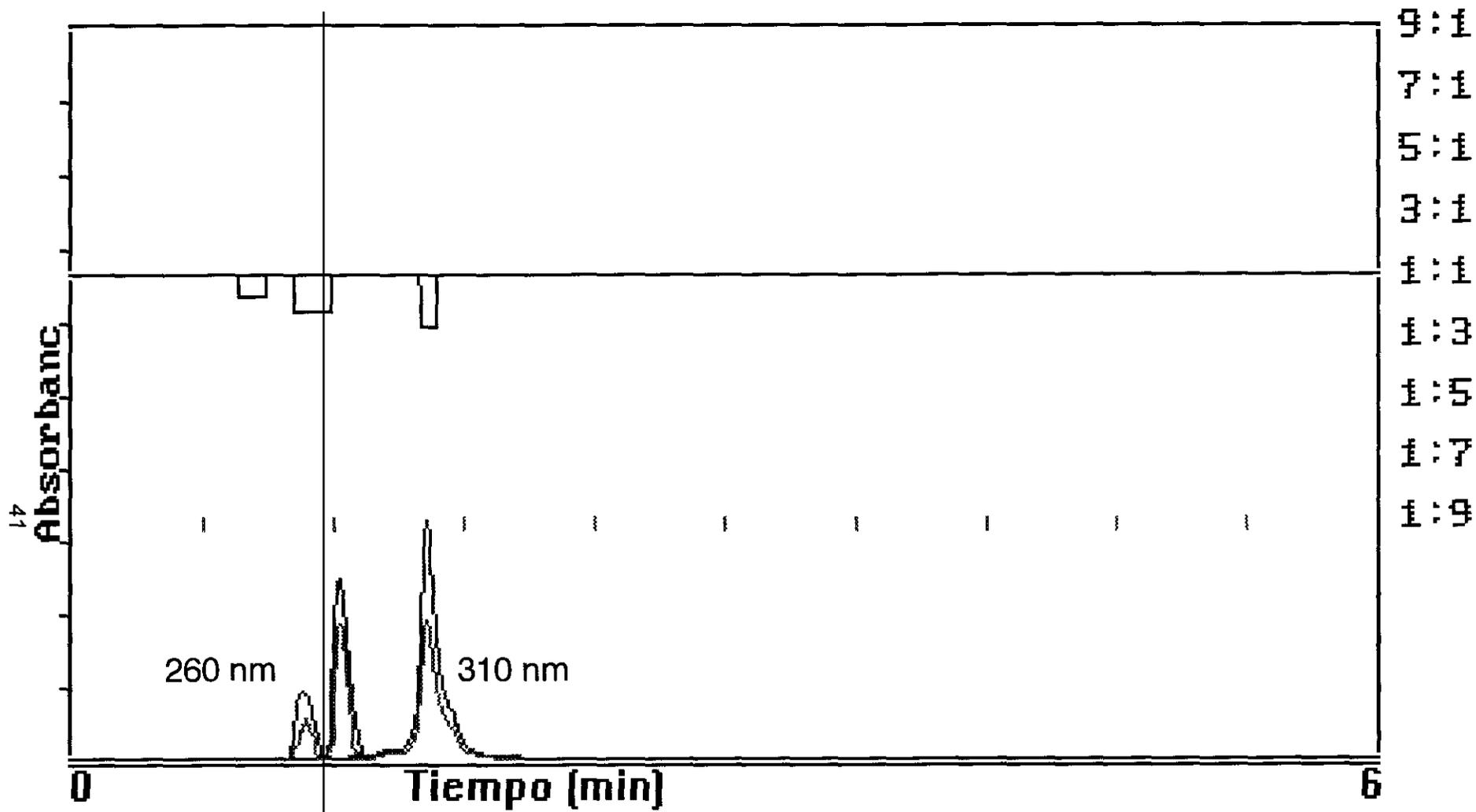


Figura 8.- Análisis del Ratio de la Cefprozil degradada. T=30 °C y pH=5.

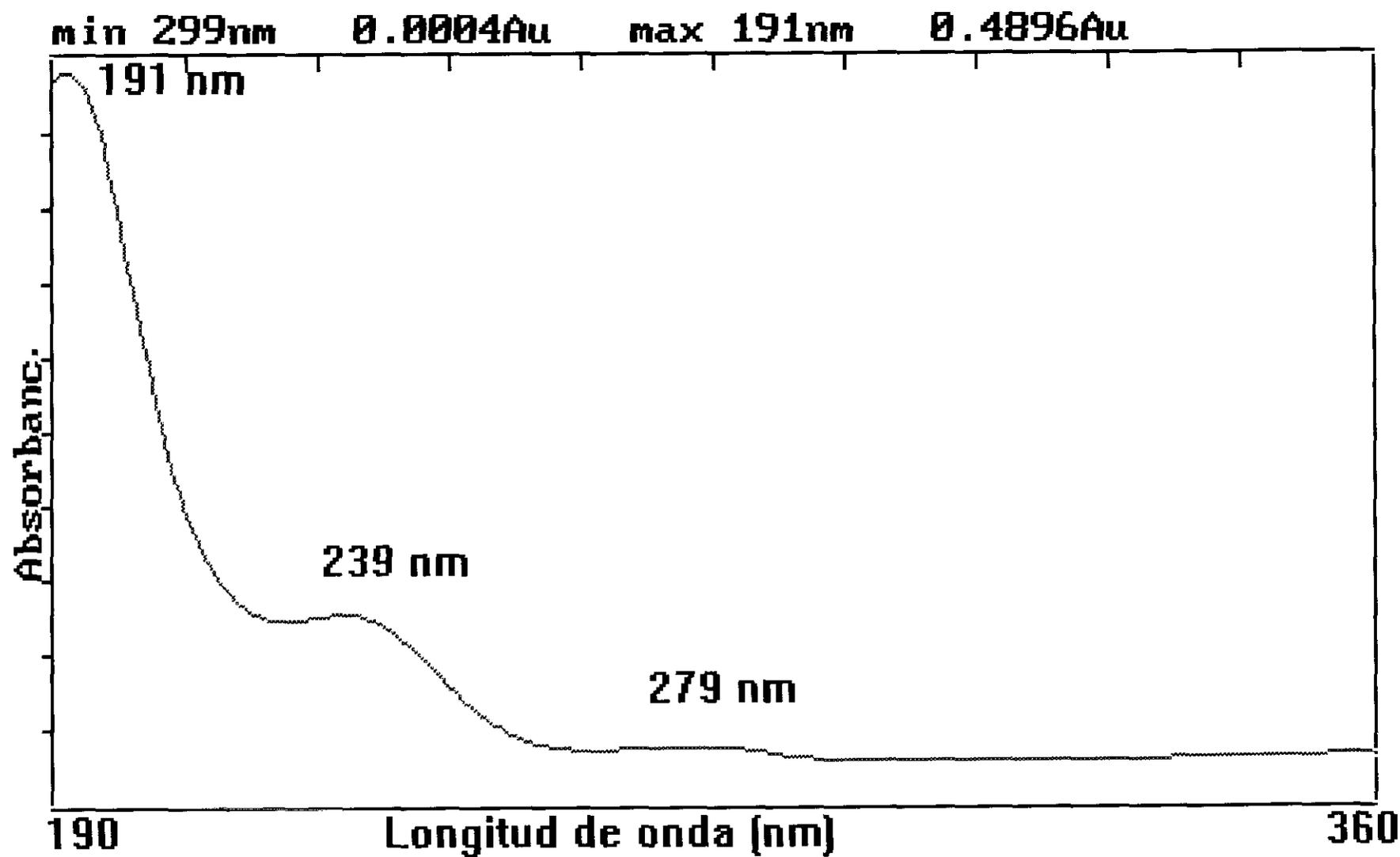


Figura 9.- Espectro U.V. del pico de $t_r=1.15$ min. $T=30$ °C y $pH=5$.

aunque los máximos de absorción se manifiestan a longitudes de onda prácticamente idénticas a las de los picos I y II, el aspecto del espectro de absorción no es el mismo, disminuyendo la absorción del máximo a 279-280 nm y aumentando el de 190-200 nm.

El pico cromatográfico III, no se manifiesta a tiempo inicial y va aumentando conforme transcurre el tiempo de hidrólisis, por lo que debe ser atribuido a un producto de hidrólisis de la Ceftizoxima, el más previsible de los cuales sería el 7-desmetil ADCA. Este producto no es posible encontrarlo en los distribuidores ni nos pudo ser suministrado por los laboratorios farmacéuticos a los que se les solicitó, pero si dispusimos del 7-ADCA, suministrado por SKF, cuyo espectro U.V. y cromatograma no deben diferir en exceso del 7-desmetil ADCA.

Por ello, efectuamos una inyección de este producto, en las mismas condiciones cromatográficas, obteniendo el cromatograma que se muestra en la figura 10, donde se manifiesta un solo pico cromatográfico, con un tiempo de retención de 1,10 min., prácticamente idéntico al observado en el pico III del cromatograma de la figura 7. El espectro U.V. del 7-ADCA se muestra en la figura 11, siendo idéntico al del pico III (figura 9), por tanto este pico cromatográfico, debe asignarse al 7-desmetil ADCA.

Los cromatogramas presentan el mismo perfil, en los distintos valores de pH y temperaturas.

Por todo lo manifestado, se puede establecer que el mecanismo de hidrólisis de la Ceftizoxima en los valores de pH entre 2 y 8, debe de dar como productos el 7-desmetil ADCA y el ácido tiazoxímico, que aunque no se observe en

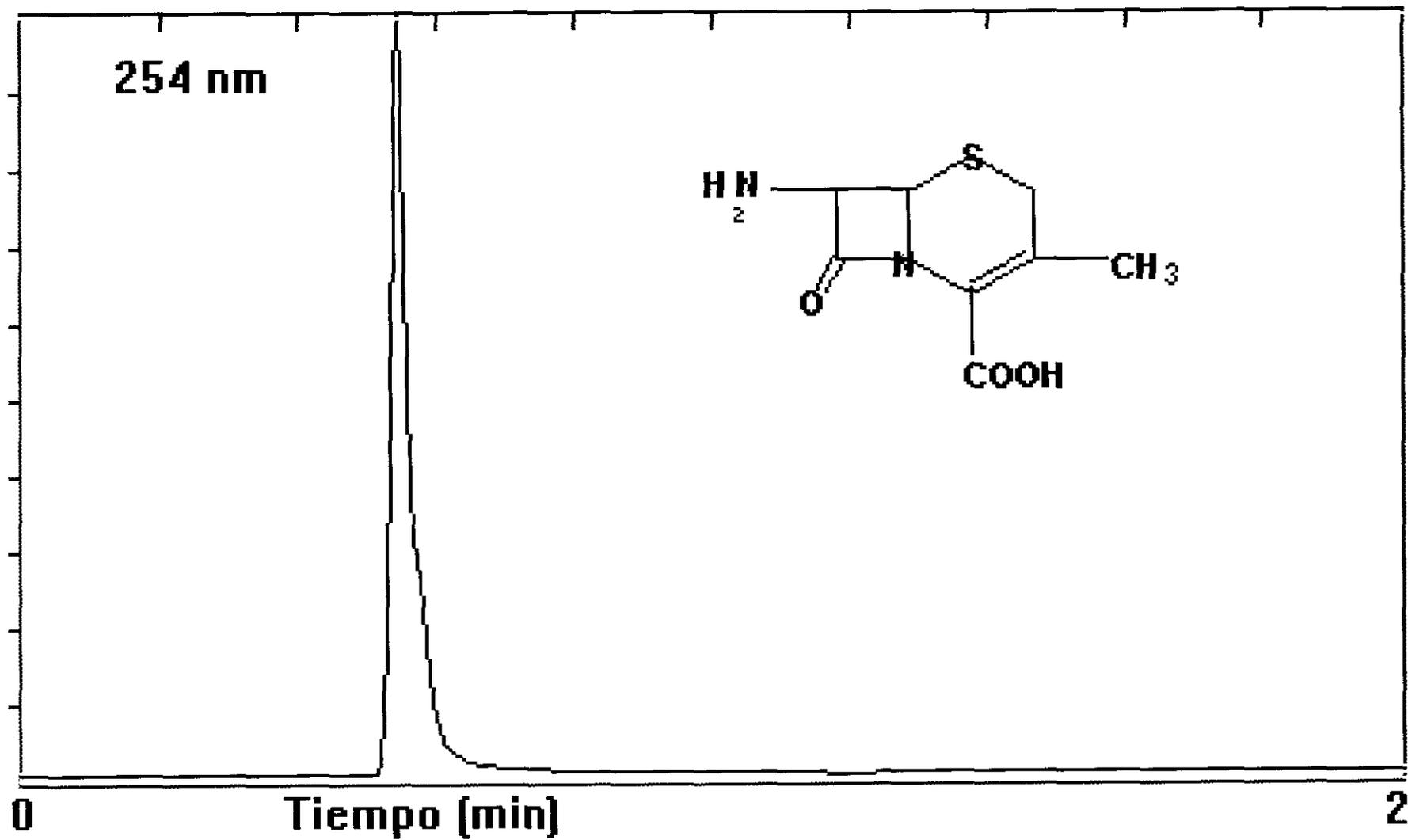


Figura 10.- Cromatograma del 7 ADCA. T=30 °C y pH=5.

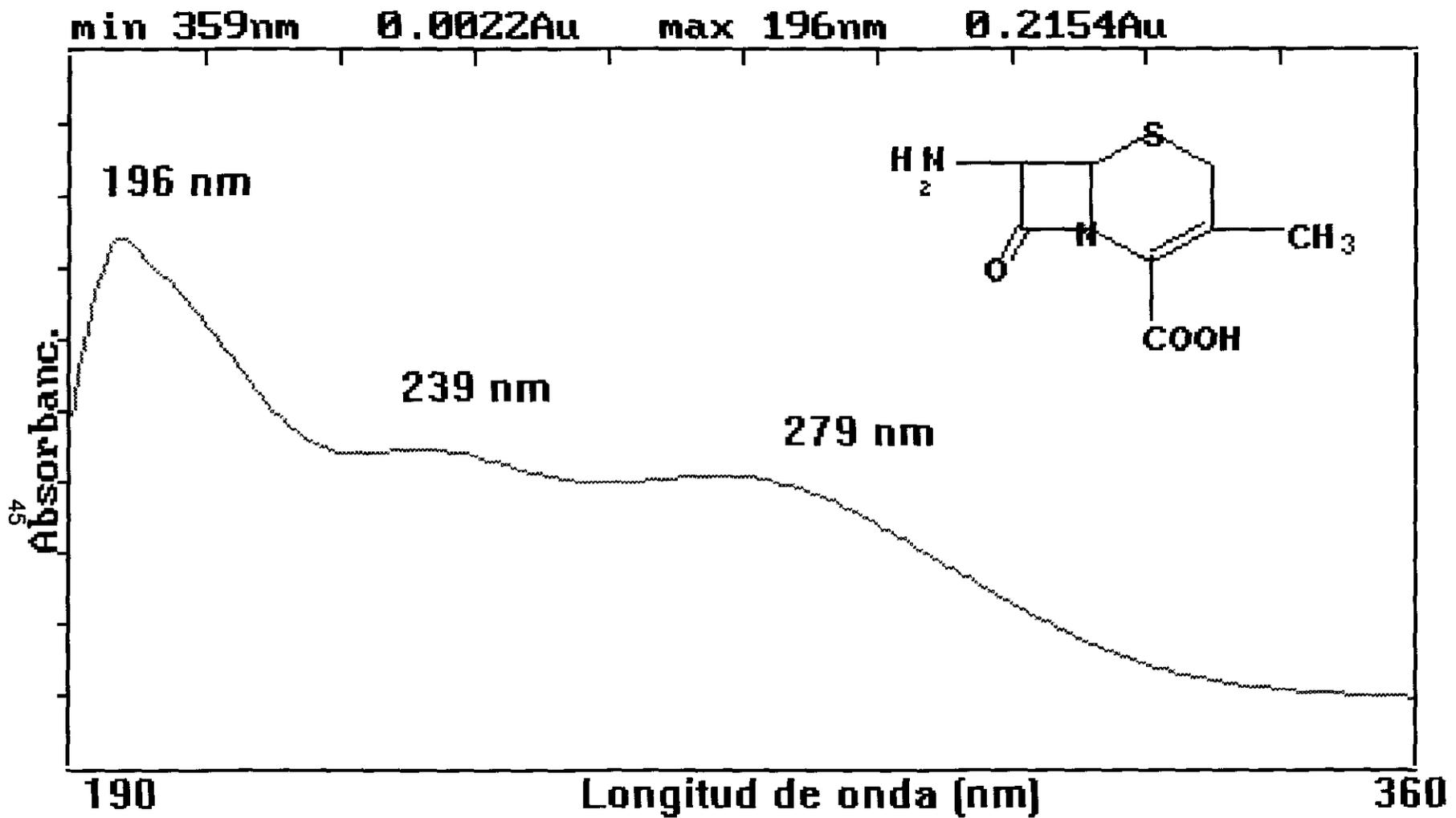
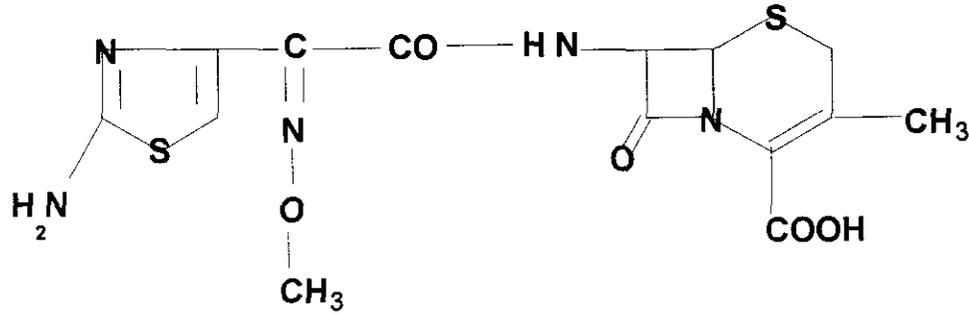


Figura 11.- Espectro U.V. del 7-ADCA.

el cromatograma, es el único producto posible cuando se rompe la Cefitioxima en 7-desmetil ADCA, tal como se observa en la figura 12.

La aparición de dos picos a tiempo inicial, debe atribuirse como hemos dicho, a la presencia de los dos isómeros sin y anti, tal como se muestra en la figura 13.

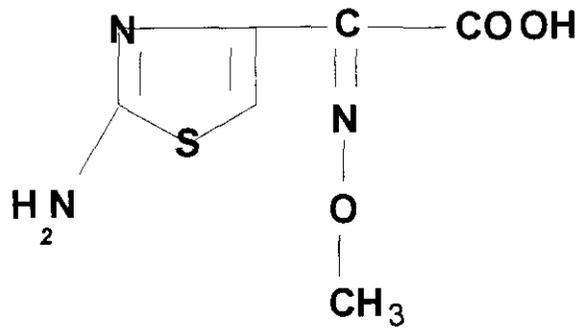
Este mecanismo de reacción, es la ruta de degradación más habitual para las desacetoxicefalosporinas, como la Cefitioxima.



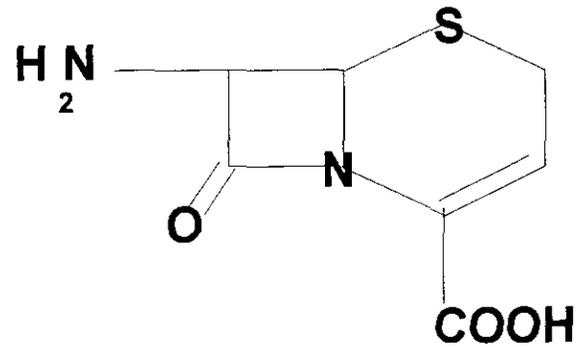
CEFTIZOXIMA



AC. TIAZOXIMICO

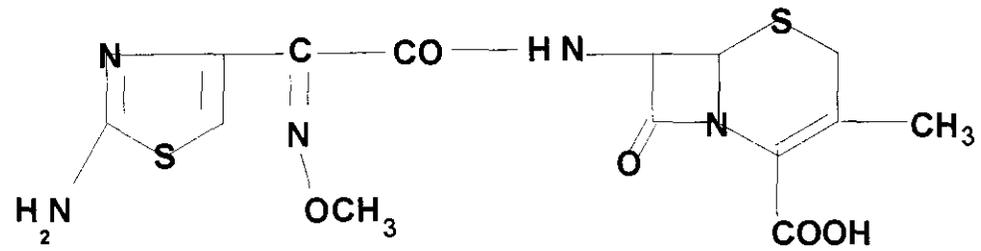


7 DESMETIL ADCA

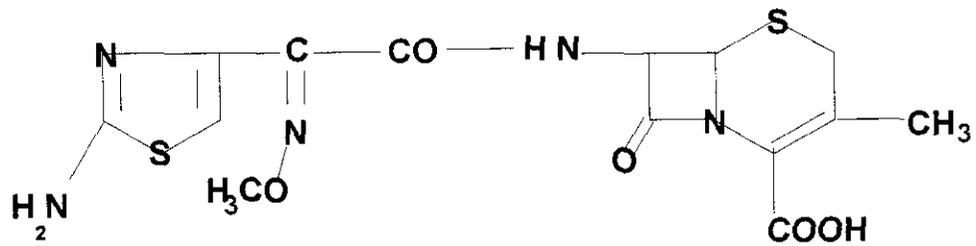


47

Figura 12 .- Mecanismo de degradación de la Cefprozil.



SIN



ANTI

Figura 13 .- Isómeros de la Cefprozil.

Adición de Cobre

Cuando se adiciona Cu(II) a la Cefprozil, independientemente de la concentración de ion metálico, a pH 5 y a tiempo inicial, se observa en el cromatograma de la figura 14, dos picos cromatográficos. El pico I, se manifiesta a un tiempo de retención de 6,85 min. y el pico II a 8,14 min. Este perfil es idéntico en todas las temperaturas ensayadas.

Los espectros U.V. correspondientes a estos dos picos, se muestran en las figuras 15(I) y 16(II) respectivamente, resultando ambos idénticos y similares a los obtenidos en los picos I y II de la Cefprozil a tiempo inicial (figuras 5 y 6), si bien los tiempos de retención son muy diferentes. Por ello, estos dos picos cromatográficos a 6,85 y 8,14 min., que no se manifiestan en el cromatograma de la Cefprozil y cuyas áreas disminuyen con el tiempo de hidrólisis, deben de ser atribuidos a la formación del complejo Cefprozil-Cu, cuyo espectro U.V. debe coincidir con el de la Cefprozil, tal como pusimos de manifiesto en la formación de los complejos con Ampicilina(100) y Amoxicilina(99).

A partir de 1 hora de hidrólisis se manifiesta un tercer pico cromatográfico a tiempo de retención de 5,8 min., tal como se muestra en la figura 17. El pico III, cuya área va aumentando con el tiempo, presenta un máximo de absorción a 308 nm, tal como se observa en la figura 18, que es característico del producto de hidrólisis del complejo Cefprozil-Me.

En la figura 19, se muestra el análisis de la relación de longitudes de onda o Ratio entre 260 y 310 nm, observándose una buena relación de pureza en los hombros obtenidos.

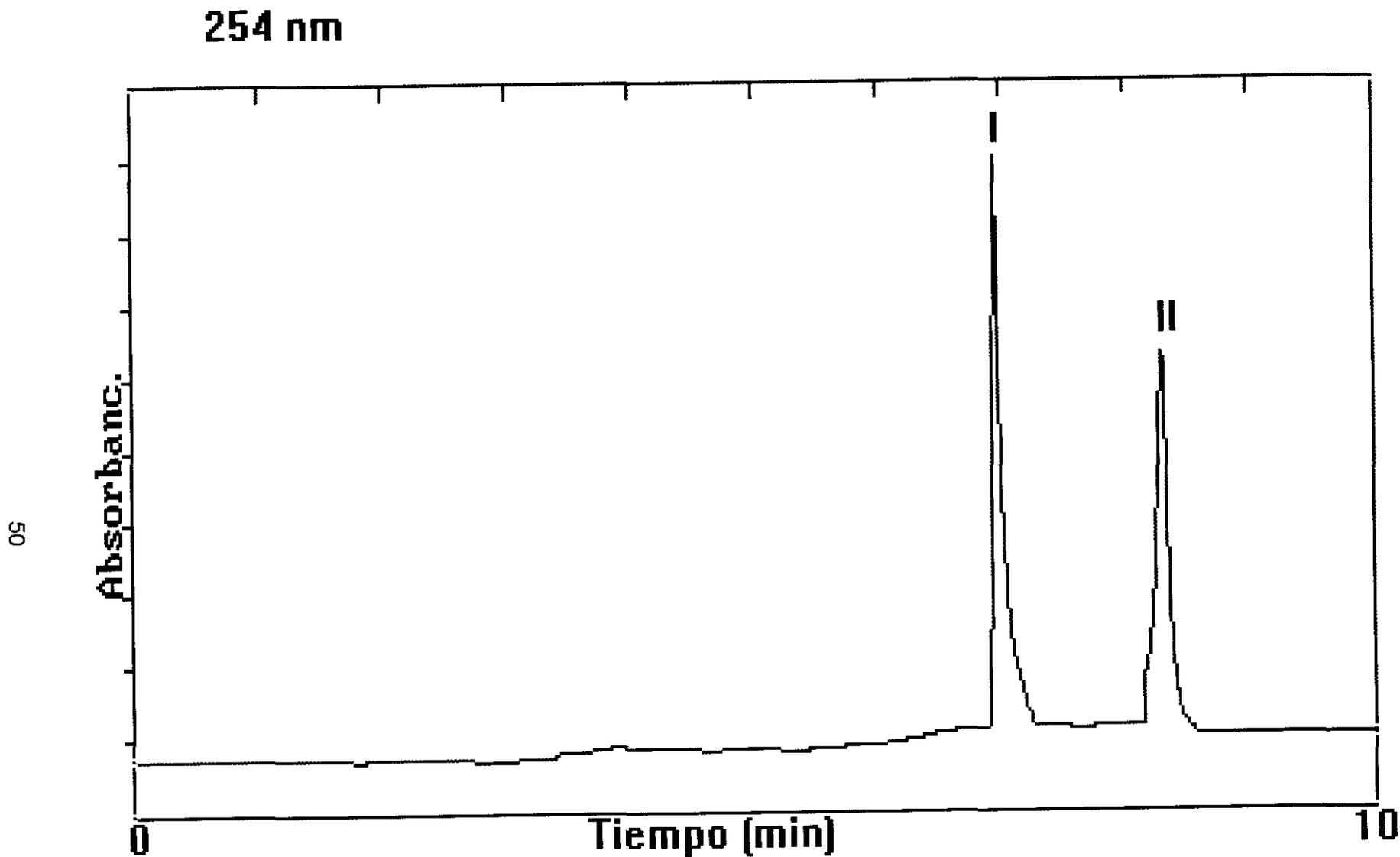


Figura 14.- Cromatograma de la Cefprozime a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$, a tiempo inicial, con adición de Cu. I. $\text{tr}=6,85\text{ min}$. II. $\text{tr}=8,14\text{ min}$.

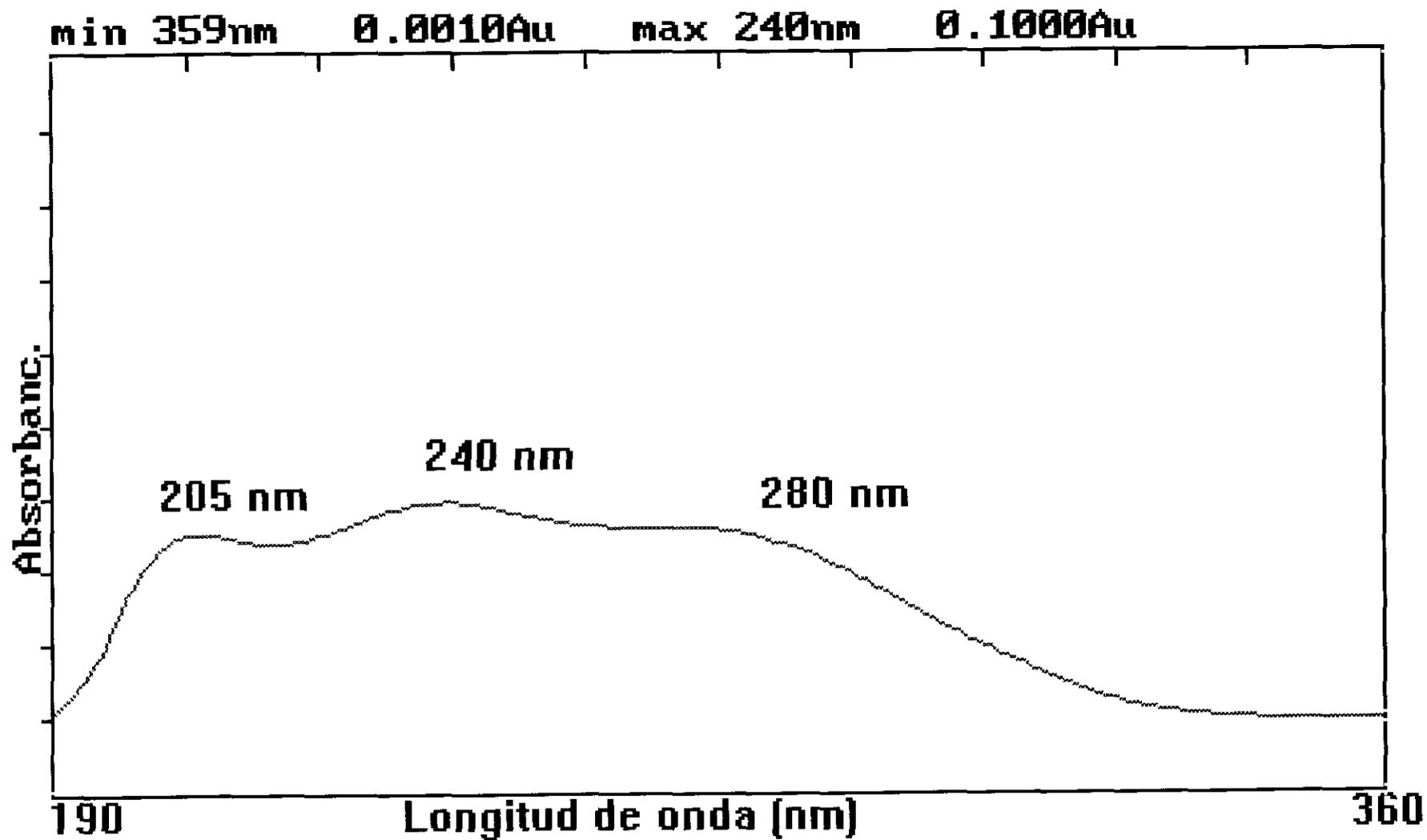


Figura 15.- Espectro U.V. del pico de $t_r=6,85$ min.

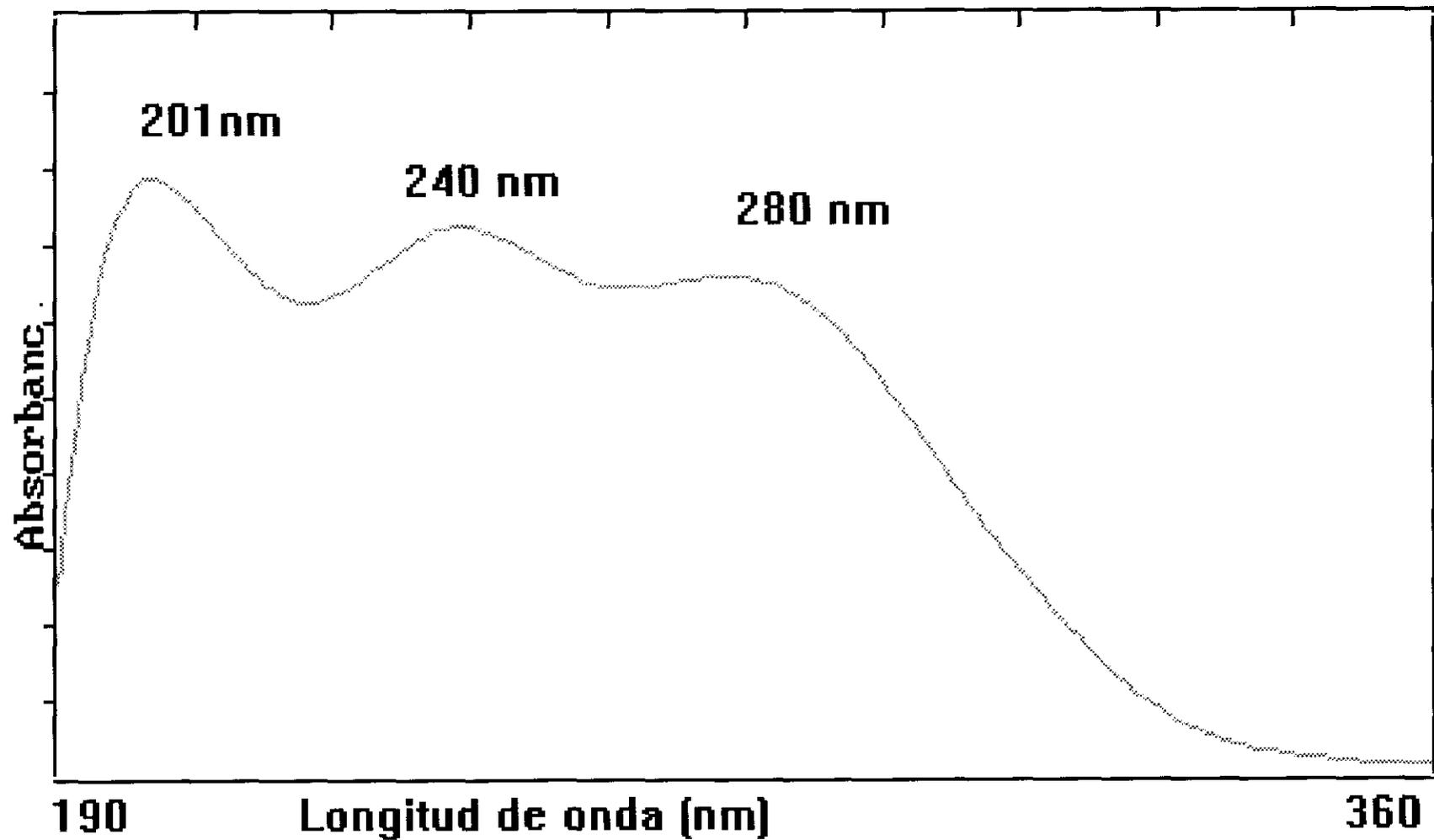


Figura 16.- Espectro U.V. del pico de $t_r=8,14$ min.

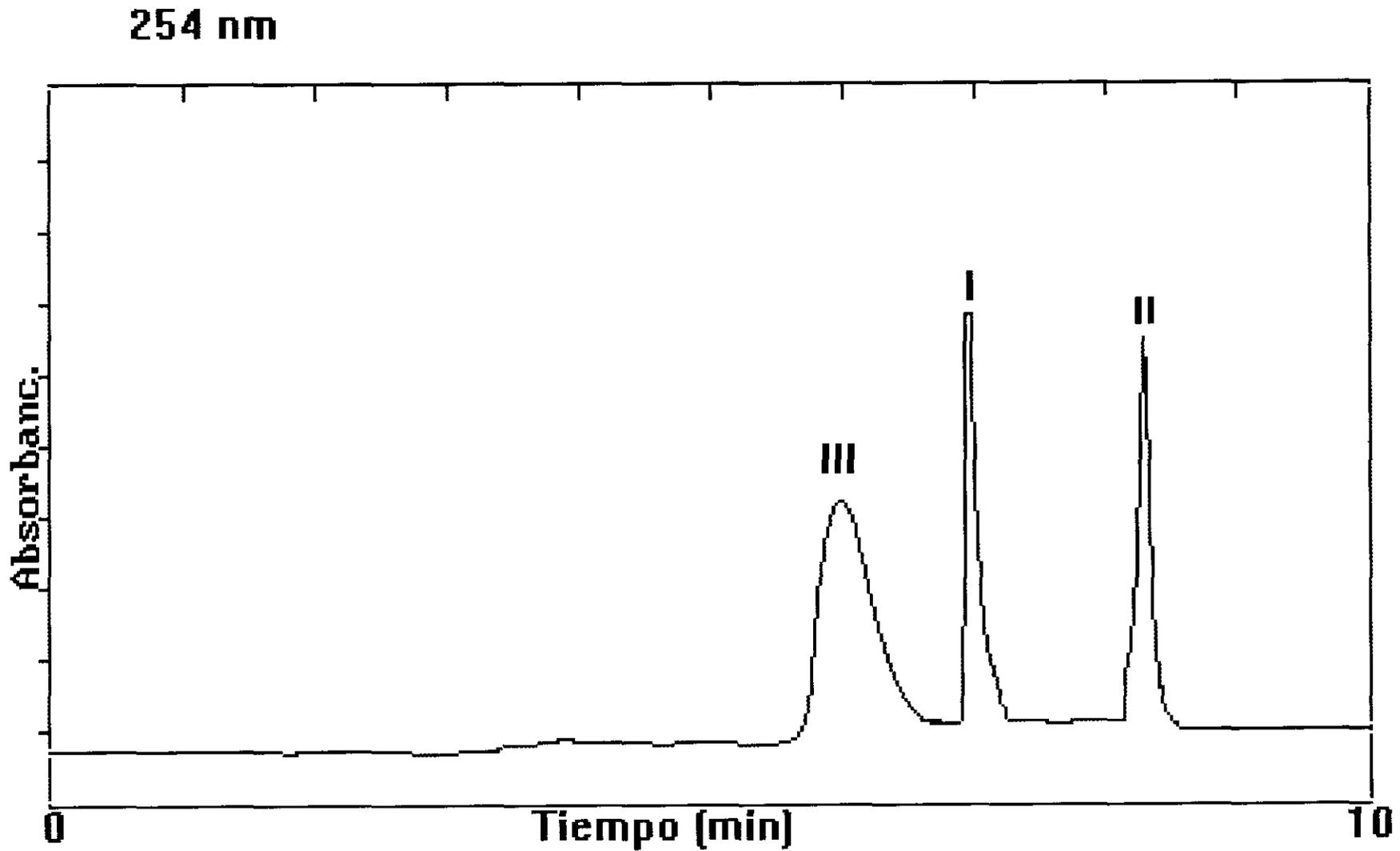


Figura 17.- Cromatograma de la Cefprozil a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$, degradada con adición de Cu. I. tr=6,85 min.II. tr=8,14 min.III. tr=5,8 min.

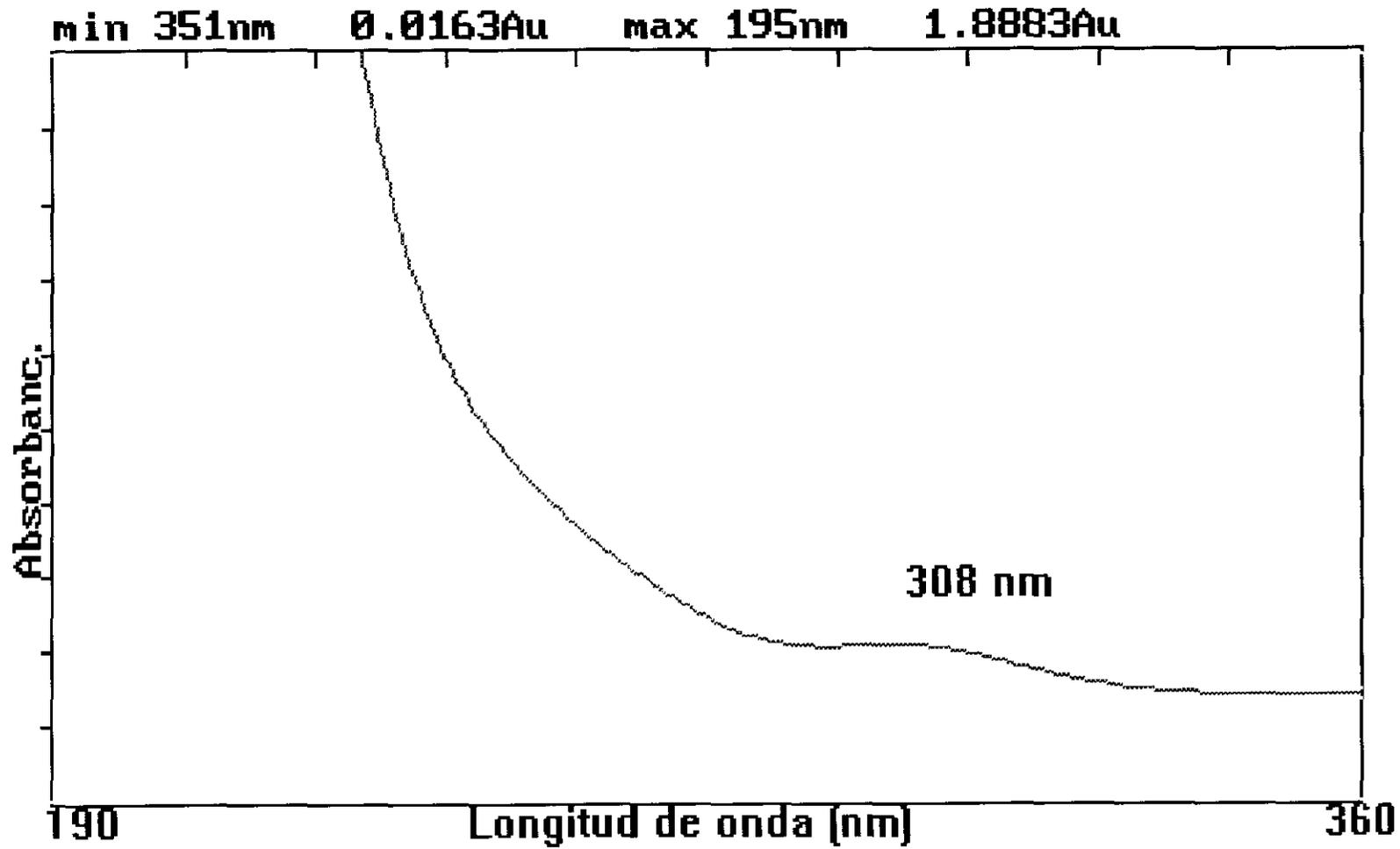


Figura 18.- Espectro U.V. del pico de $t_r=5,80$ min.

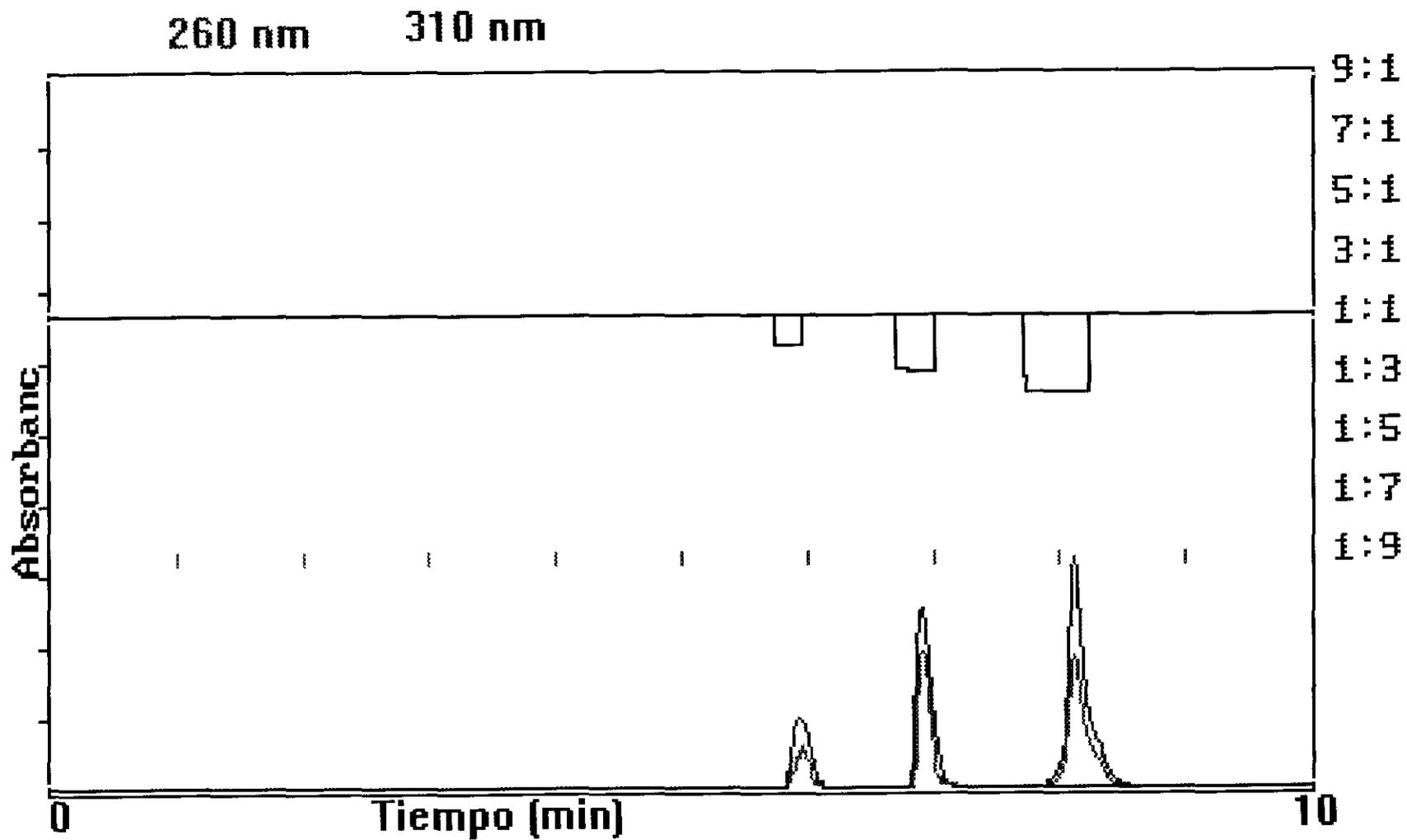


Figura 19.- Análisis del Ratio de la Ceftizoxima degradada con adición de Cu. T=30 °C y pH=5.

Es de resaltar, que a tiempo inicial no se manifiestan los picos cromatográficos correspondientes a la Ceftizoxima (1,43 y 1,66 min.), por lo que la formación del complejo se puede considerar que es instantánea y no existe Ceftizoxima residual.

También hay que considerar, que del producto hidrolítico del complejo solo se obtiene un pico cromatográfico, lo que puede corresponderse a que los dos isómeros compartan el mismo pico cromatográfico, es decir no exista separación cromatográfica, o más probablemente, ya que del estudio de pureza no se deduce esta situación, que la concentración de uno de ellos sea tan baja que no sea detectada en el cromatograma.

Sin embargo, en los valores de pH 2-4, a tiempo inicial se manifiestan tres picos cromatográficos, tal como se observa en la figura 20. Los picos I y II, tienen tiempos de retención idénticos (6,85 y 8,14 min.) a los obtenidos en el cromatograma a pH 5 (figura 14) y cuyos espectros U.V. son así mismo similares, tal como se ponen de manifiesto en las figuras 21 y 22. El pico III, por su parte con un tiempo de retención de 4,37 min., no se manifiesta ni en el cromatograma de la Ceftizoxima, ni en el de Ceftizoxima-Cu a pH=5 y también disminuye su área con el tiempo de hidrólisis, tal como sucede con los picos I y II. El espectro U.V. del pico III se da en la figura 23, donde se observa que es idéntico al del 7-ADCA (figura 10).

Por todo ello, se puede establecer que los picos cromatográficos I y II se corresponden con los isómeros del complejo Ceftizoxima-Cu, lo que sucede en todos los valores de pH ensayados y el pico III que solo se manifiesta en los valores de pH 2-4 debe asignarse a la formación de un complejo 7-desmetil ADCA-Cu.

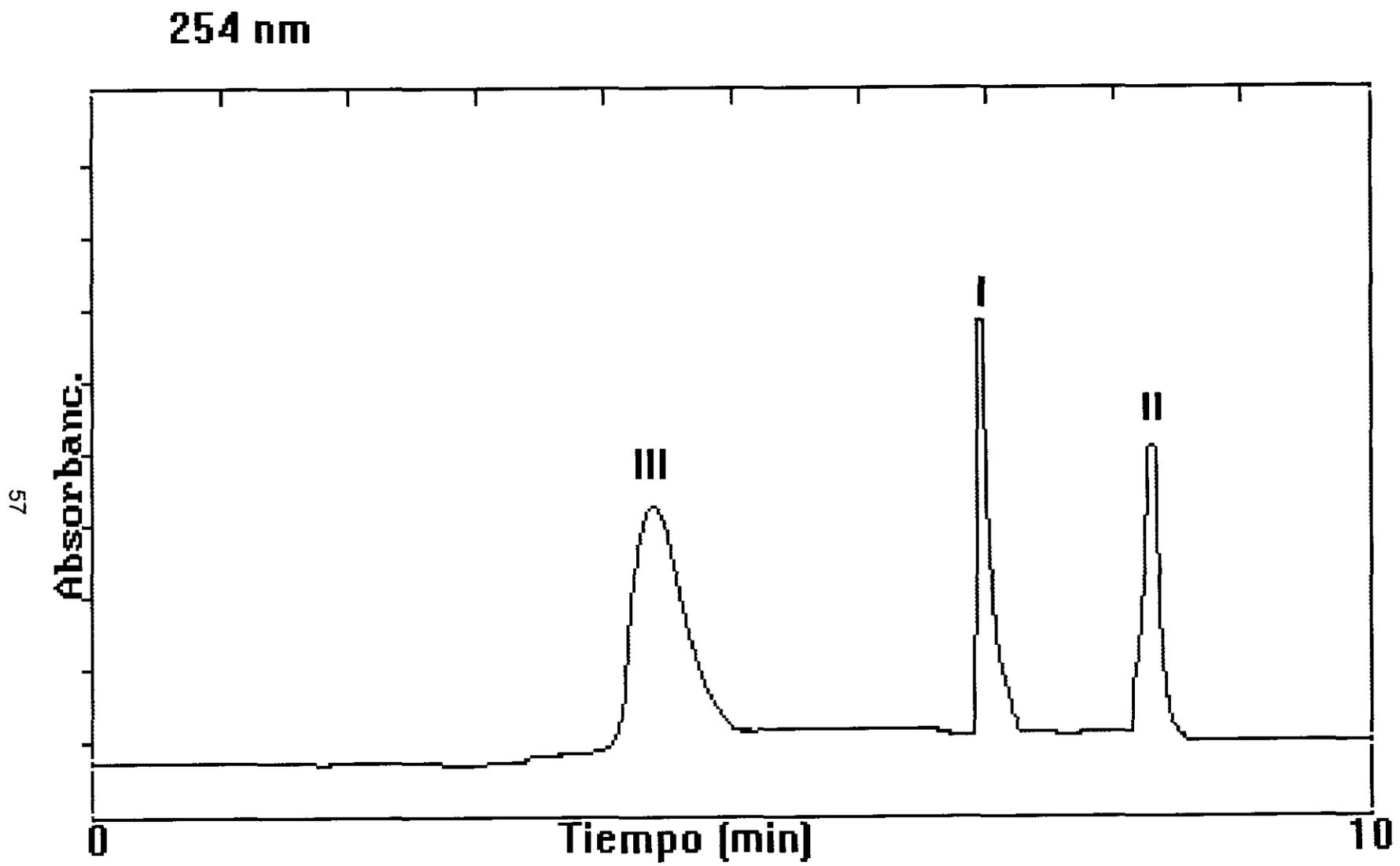


Figura 20.- Cromatograma de la Cefprozime a T=30 °C y pH=4, a tiempo inicial, con adición de Cu. I. tr=6,85 min.II. tr=8,14 min.III. tr=4,37 min.

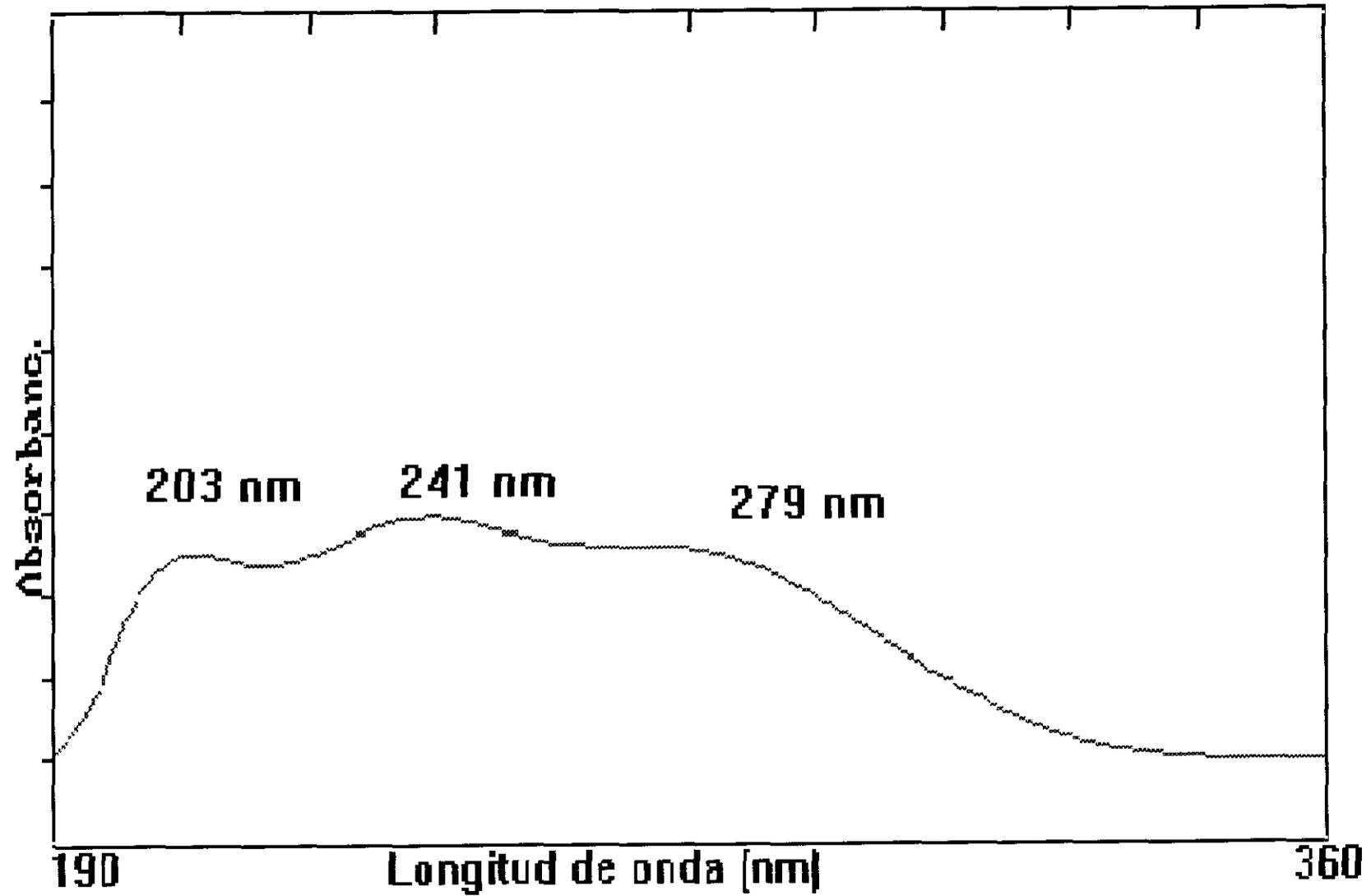


Figura 21.- Espectro U.V. del pico de $t_r=6.85$ min.

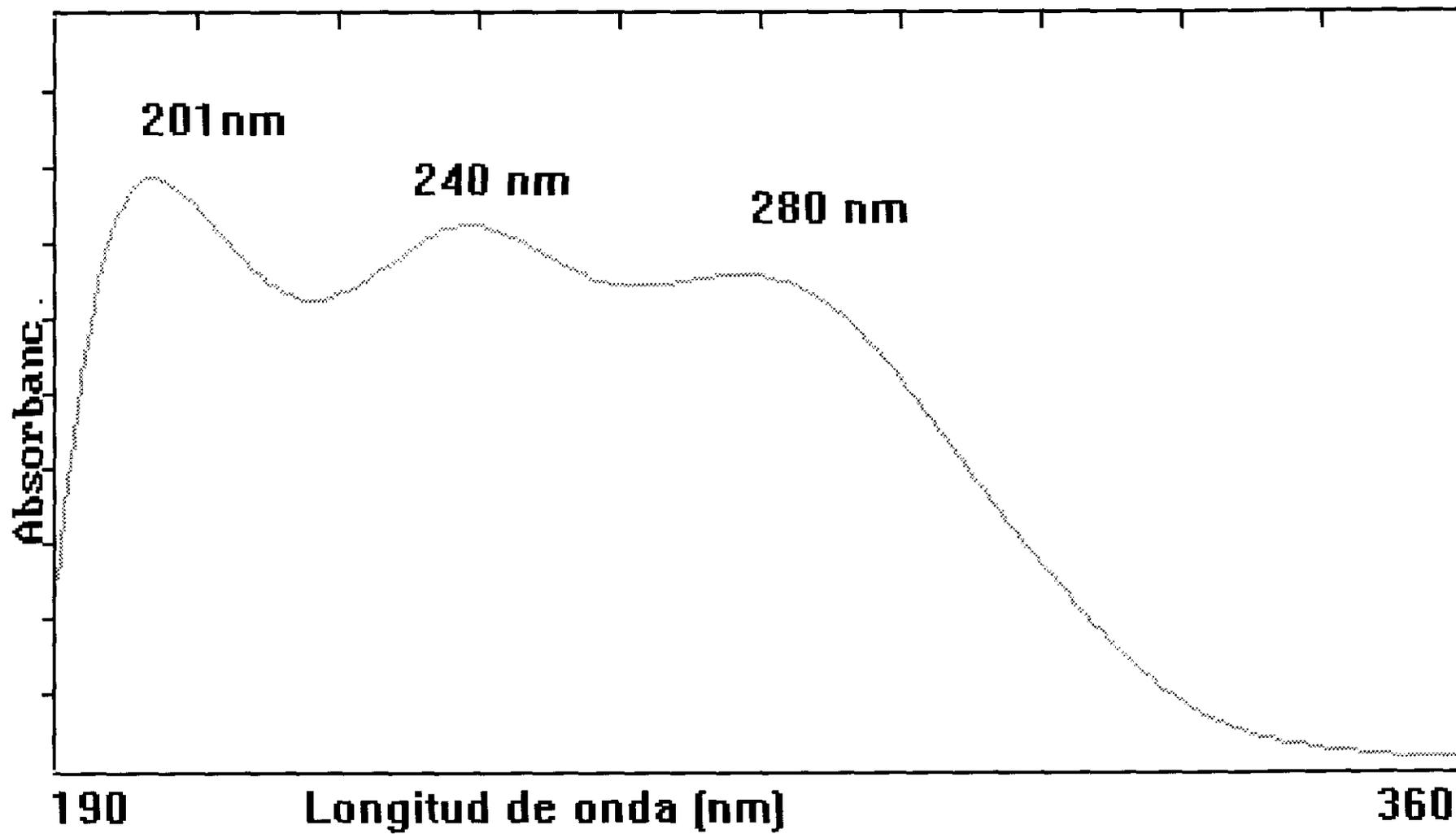


Figura 22.- Espectro U.V. del pico de $t_r=8,14$ min.

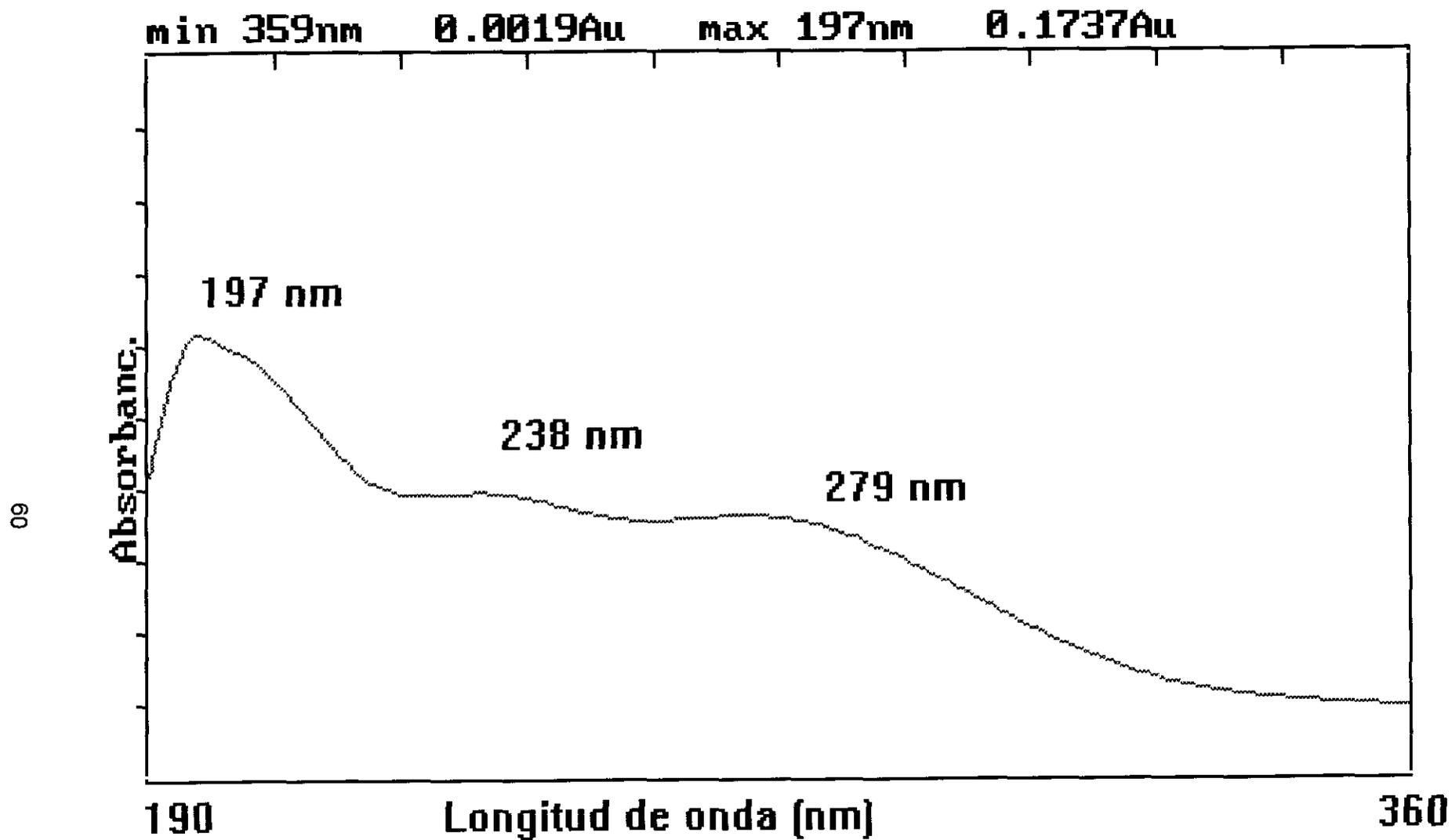


Figura 23 .- Espectro U.V. del pico de tr=4,37 min.

De nuevo, como sucede en el pH 5, en los valores de pH 2 a 4, al cabo de 1 hora de hidrólisis, se manifiesta un nuevo pico cromatográfico, en esta caso el IV, con un tiempo de retención de 5,8 min., tal como se muestra en la figura 24 y cuyo análisis de pureza por comparación entre las longitudes de onda 260 y 310 nm se muestra en la figura 25, donde se aprecia la pureza de todos los picos comentados. El pico IV, como sucede en su homólogo a pH 5, manifiesta un espectro U.V. con un máximo a 308 nm (figura 26), que como en el caso anterior debe asignarse al producto de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-Cu.

Si comparamos la respuesta cromatográfica del pico de tiempo de retención 8,14 min., asignado a un isómero del complejo Ceftizoxima-Cu, frente al pico de tiempo de retención 5,8 min., asignado a su producto de hidrólisis (figura 27), vemos como mientras que la concentración del complejo disminuye con el tiempo, en proporción similar, aumenta la de su producto de hidrólisis. Esta representación efectuada a pH 2 es extrapolable a los demás valores de pH.

En la hidrólisis de los complejos antibiótico-metal, son posibles dos mecanismos, uno hidrolítico, tal como se muestra en la figura 28 y otro no hidrolítico, tal como se observa en la figura 29, donde se representan estos mecanismos en el caso del complejo Ceftizoxima-Cu. En nuestro caso, a pH 5 es más probable el mecanismo hidrolítico propuesto en la figura 28, ya que hemos detectado el producto de hidrólisis del complejo.

Sin embargo en los valores de pH 2-4, aunque también debe manifestarse un mecanismo hidrolítico, tal como se observa en la figura 30 y no el mecanismo no hidrolítico de la figura 31, hay que tener en cuenta la formación del complejo con el 7-desmetil ADCA, lo que implica una ruptura parcial de la Ceftizoxima, antes de

254 nm

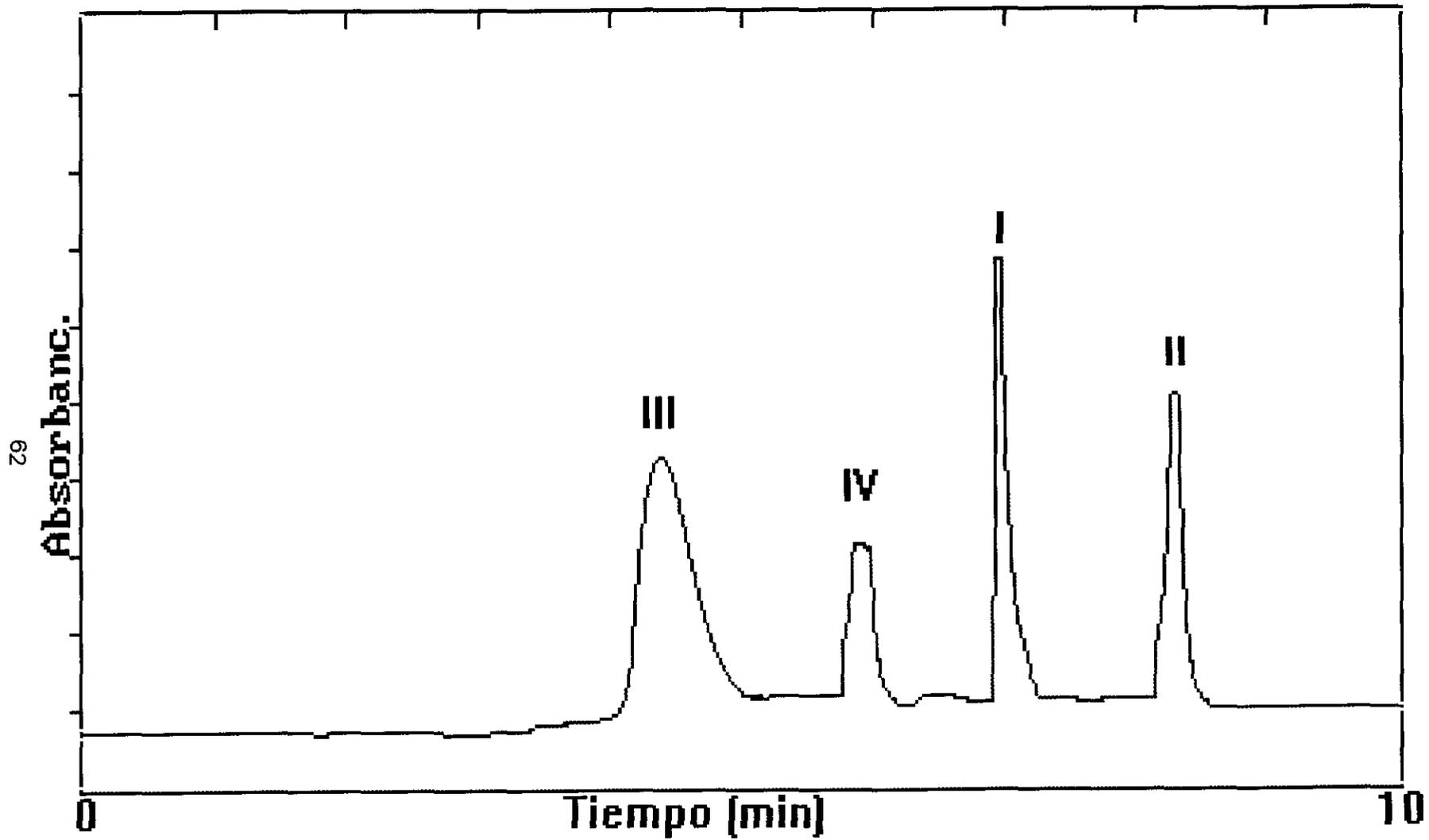


Figura 24.- Cromatograma de la Cefprozil a T=30 °C y pH=4, degradada con adición de Cu. I. tr=6,85 min.II. tr=8,14 min.III. tr=4,37 min. IV. tr=5,8 min.

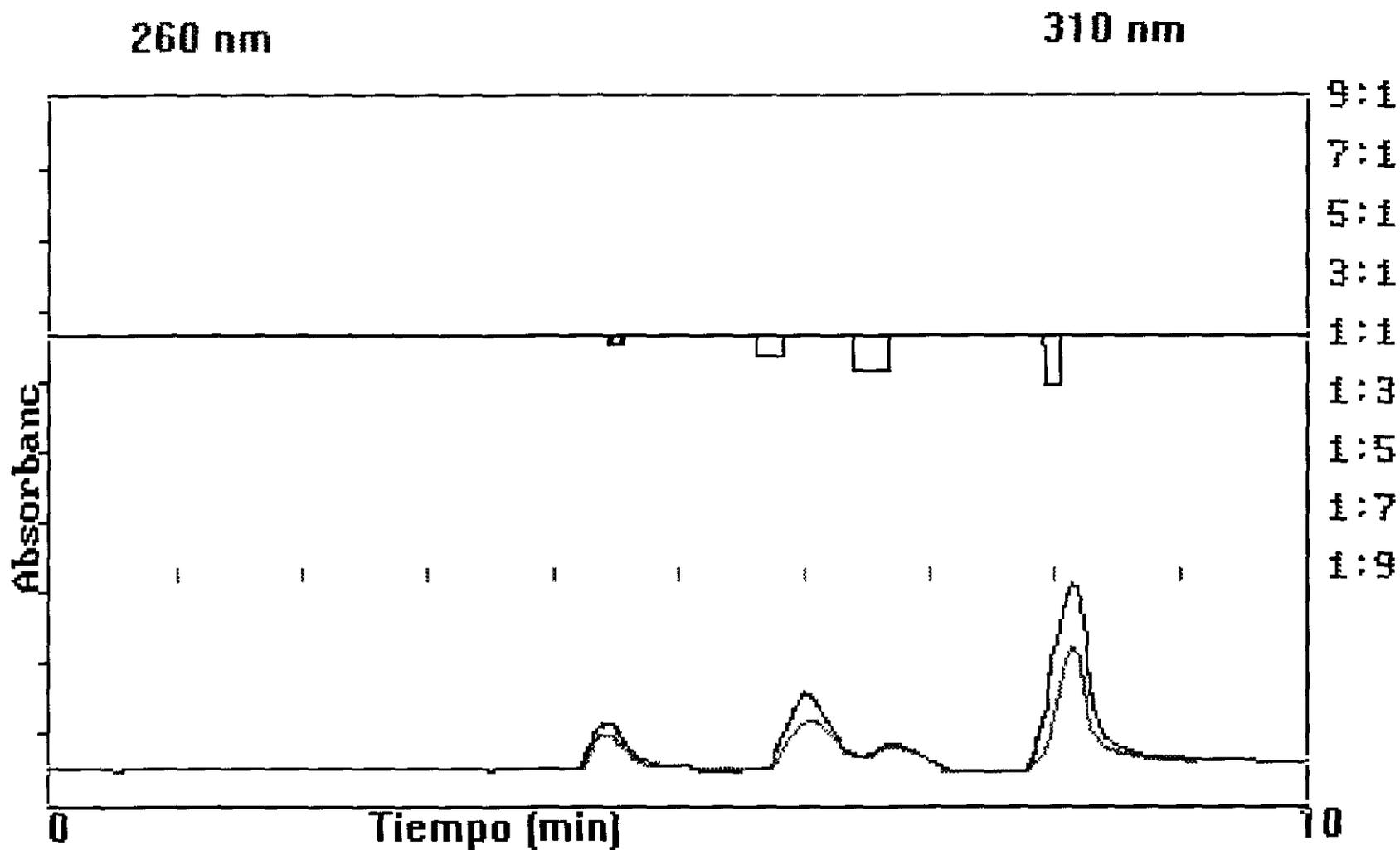


Figura 25.- Análisis del Ratio de la Cefprozil degradada con adición de Cu. T=30 °C y pH=4.

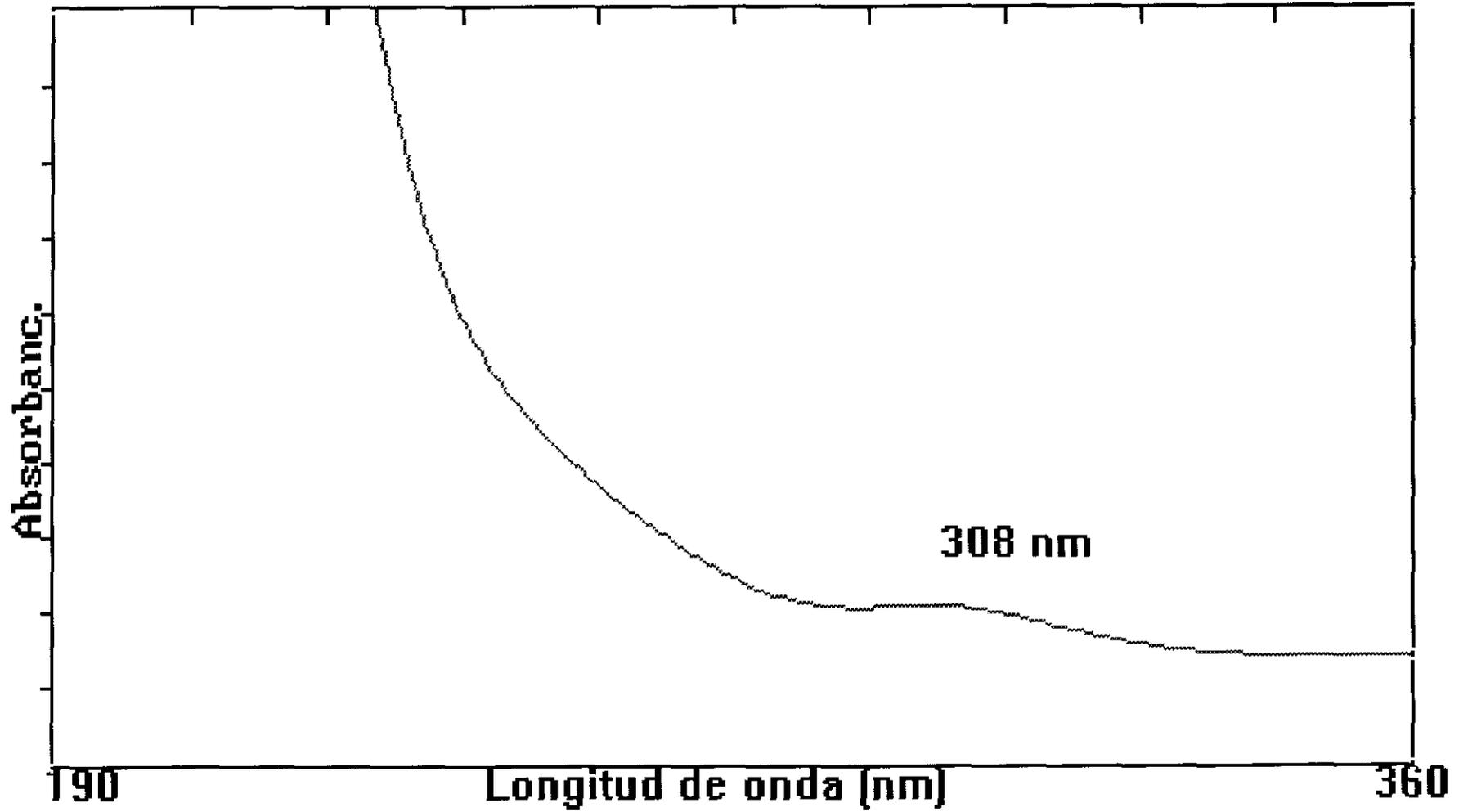


Figura 26.- Espectro U.V. del pico de $t_r=5,80$ min.

pH=2. T=30 °C

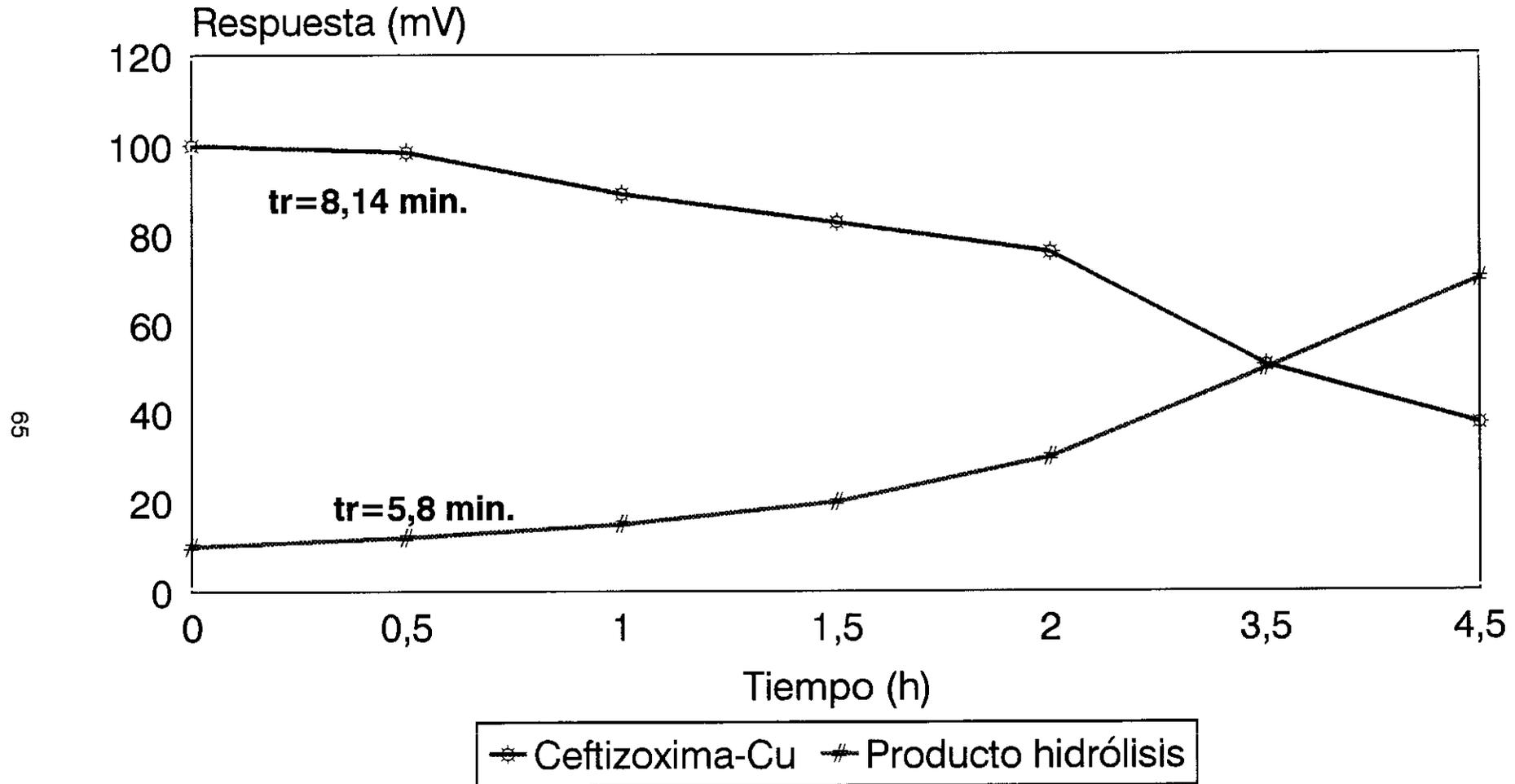


Figura 27.- Comparación de la respuesta cromatográfica entre el complejo de Cu y su producto de degradación

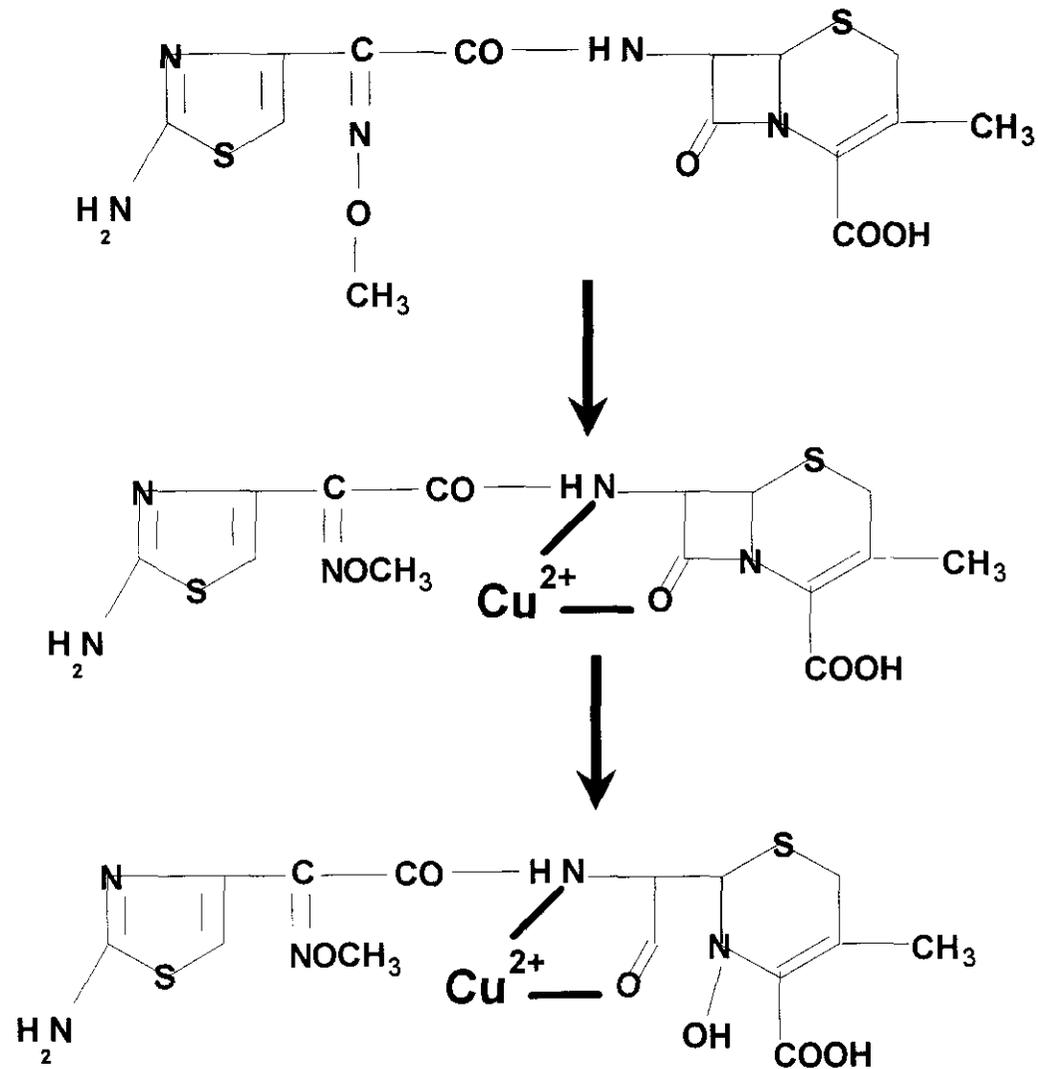


Figura 28 .- Mecanismo de reacción hidrolítico de la Ceftizoxima con adición de Cu a $\text{pH}=5$.

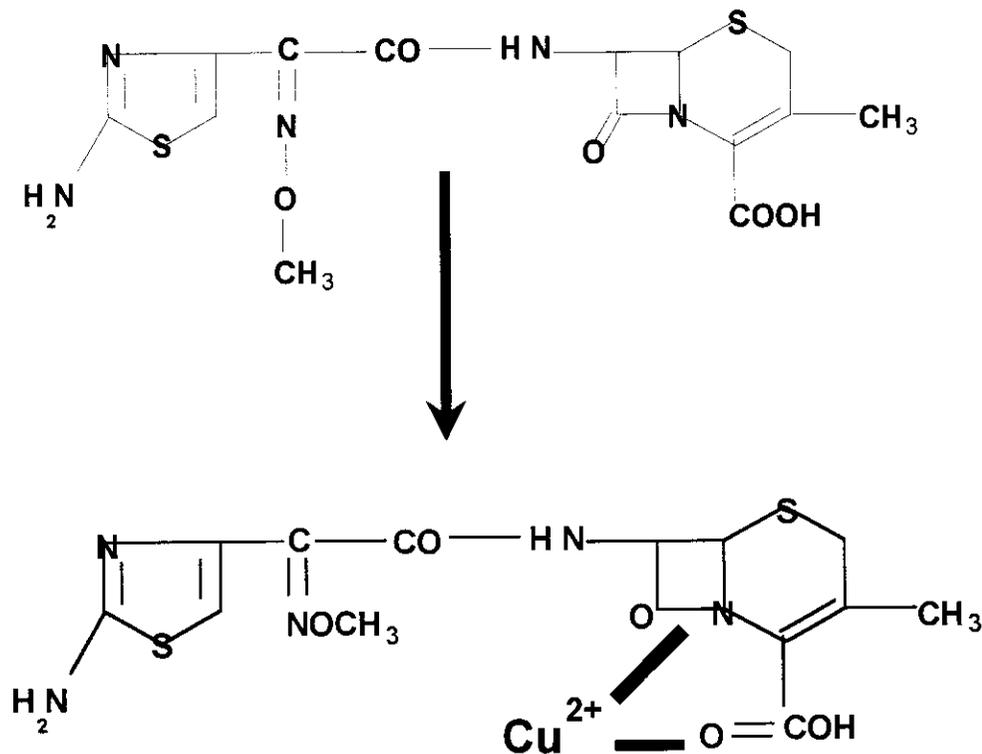


Figura 29 .- Mecanismo de reacción no hidrolítico de la Cefprozil con adición de Cu a pH=5.

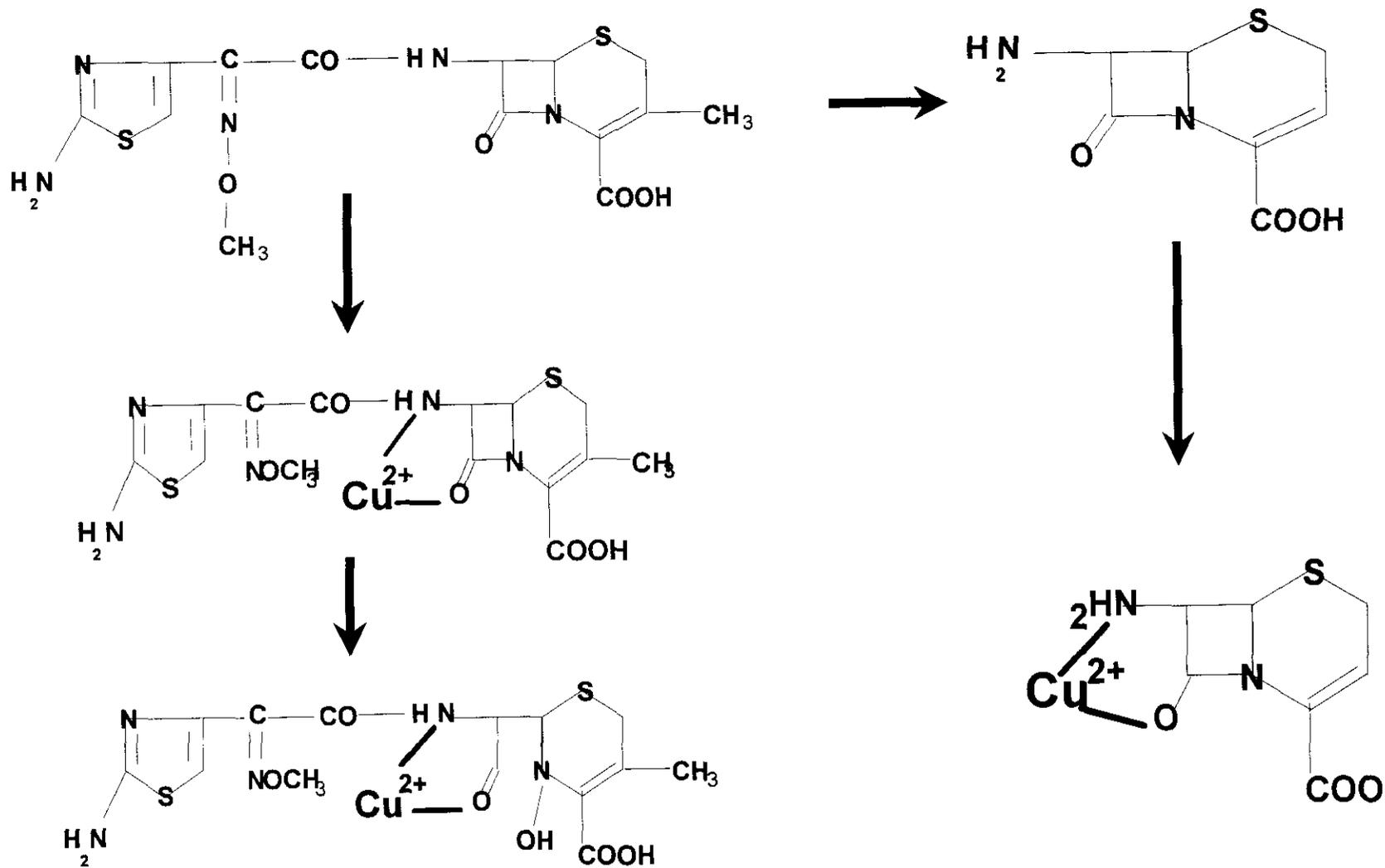


Figura 30 .- Mecanismo de reacción hidrolítico de la Ceftizoxima con adición de Cu a pH=2-4.

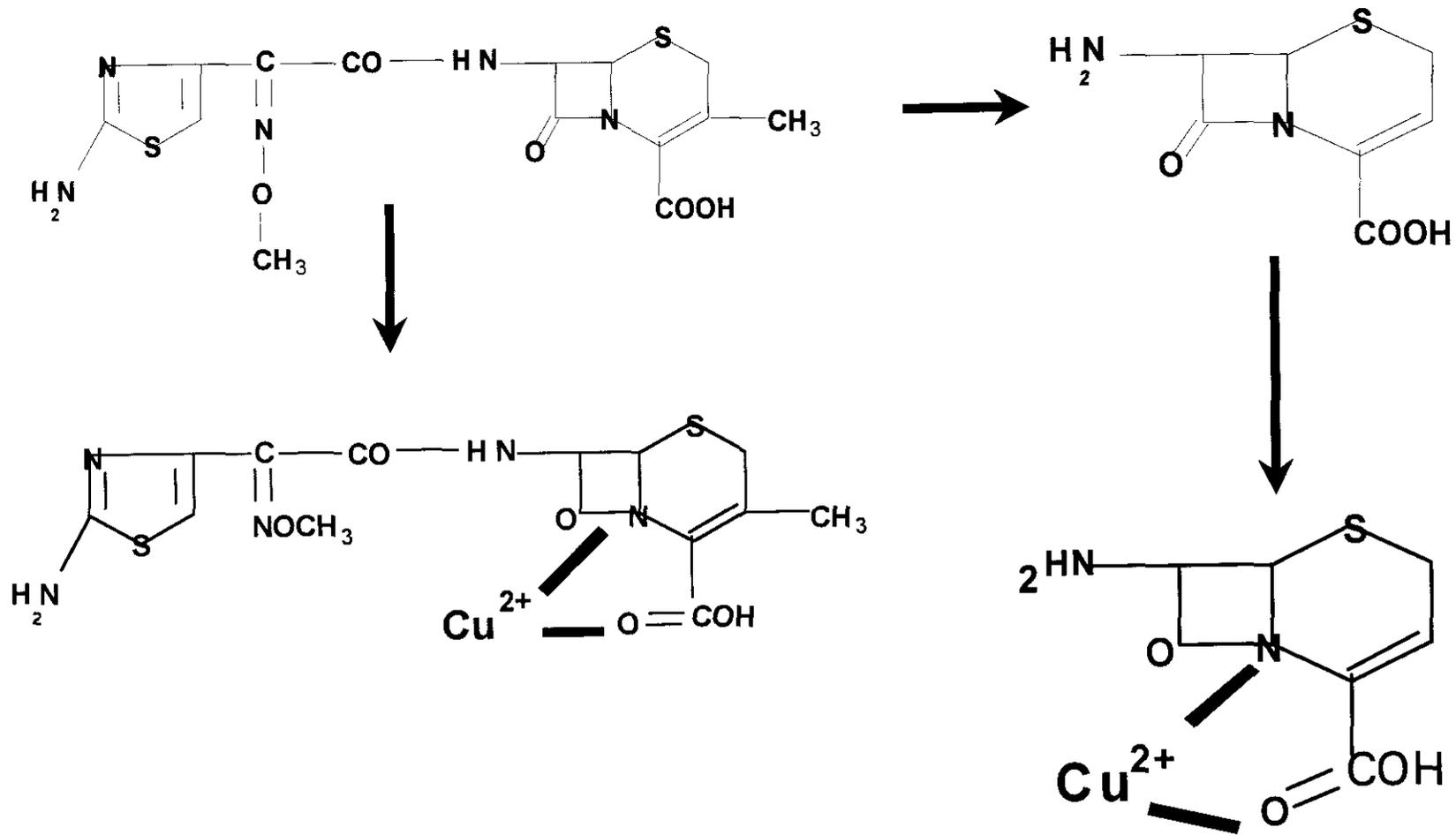


Figura 31 .- Mecanismo de reacción no hidrolítico de la Cefprozil con adición de Cu a $\text{pH}=2-4$.

formarse el complejo Ceftizoxima-Cu. El complejo con el 7-desmetil ADCA debe ser más estable, ya que no se observa ni a tiempos elevados de degradación la presencia de su producto de hidrólisis.

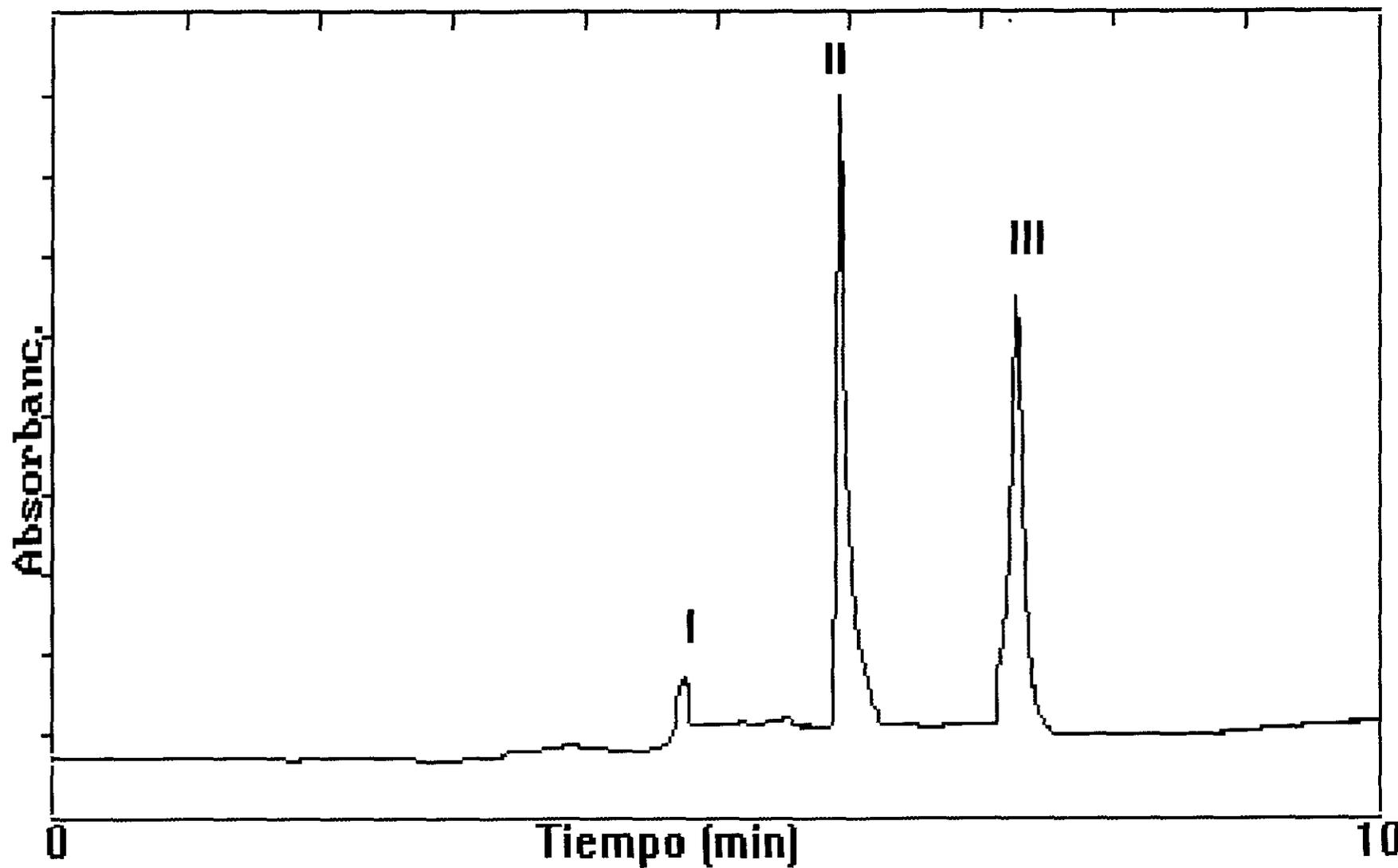
Adición de Vanadio

Cuando se adiciona V(IV) a la Ceftizoxima, se observan cromatogramas similares a los obtenidos con la adición de Cu(II), aunque con cambios no significativos en los tiempos de retención. Así, los picos I y II, correspondientes a los isómeros del complejo Ceftizoxima-Me, que se manifestaban a 6,85 y 8,14 min., en el complejo Ceftizoxima-Cu, se registran a 5,8 y 7,1 min., respectivamente en el complejo Ceftizoxima-VO, mientras que el producto de hidrólisis, cuyo tiempo de retención es de 5,8 min. en el caso del Cu(II), en el V(IV) es de 4,8 min., tal como se muestra en la figura 32, donde se observa el cromatograma obtenido después de 1 hora de hidrólisis a pH 5. Este perfil es idéntico en todas las temperaturas ensayadas.

Los espectros U.V. correspondientes a estos tres picos, se muestran en la figura 33, resultando todos idénticos a los obtenidos en los picos I, II y III de la Ceftizoxima con adición de Cu(II). Por ello, como en el caso del Cu(II) los dos picos cromatográficos a 5,8 y 7,1 min., que no se manifiestan en el cromatograma de la Ceftizoxima y cuyas áreas disminuyen con el tiempo de hidrólisis, deben de ser atribuidos a la formación del complejo Ceftizoxima-VO, y el tercer pico cromatográfico a tiempo de retención de 4,8 min.,(pico III) cuya área va aumentando con el tiempo, es característico del producto de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-VO.

Como en la adición de Cu(II), a tiempo inicial no se manifiestan los picos cromatográficos correspondientes a la Ceftizoxima (1,43 y 1,66 min.), por lo que la formación del complejo se puede considerar que es instantánea y no existe Ceftizoxima residual.

254 nm



72

Figura 32.- Cromatograma de la Ceftrizoxima a T=30 °C y pH=5, degradada, con adición de Vanadio. I. tr=4,8 min.II. tr=5,8 min.III. tr=7,1 min.

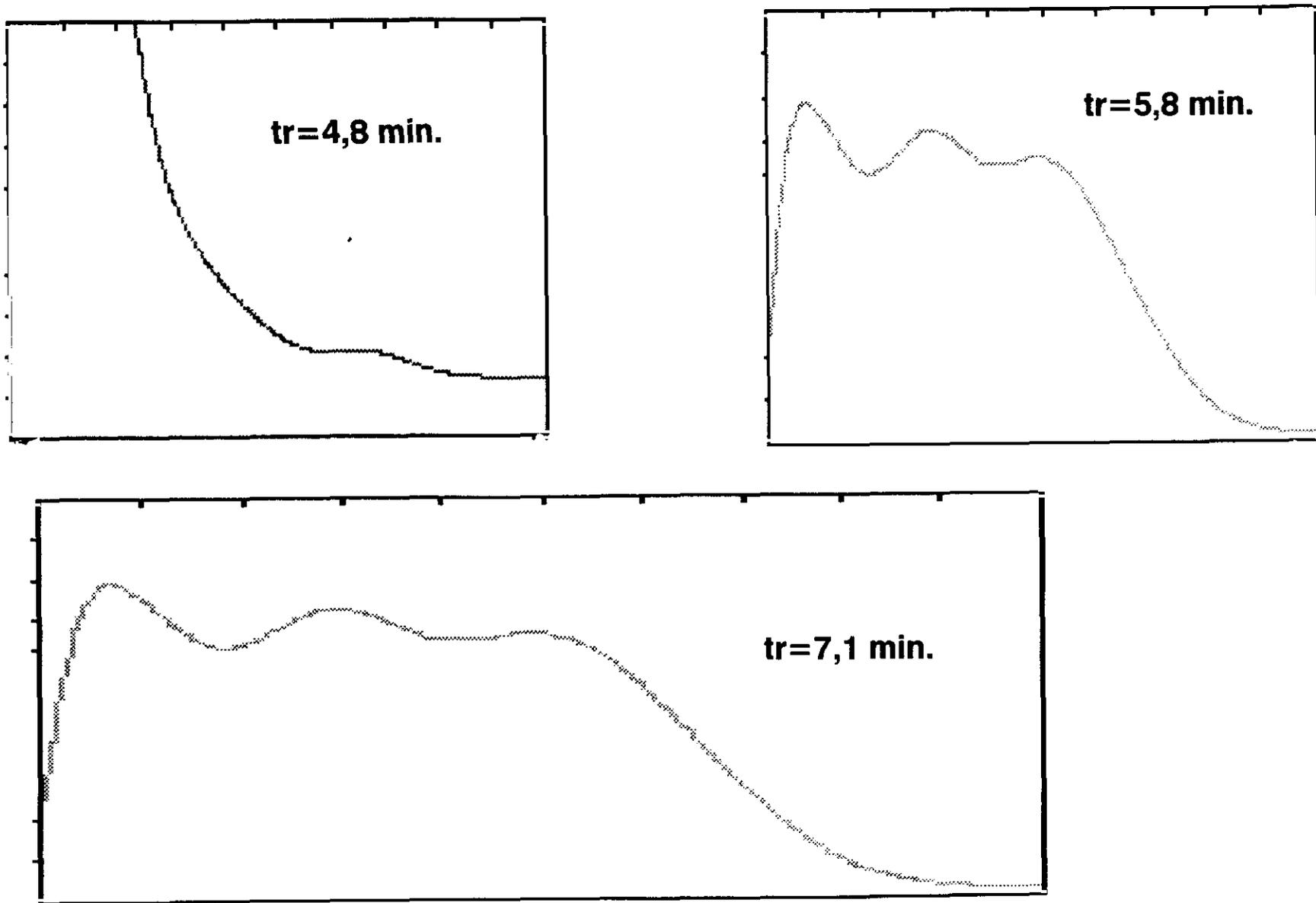


Figura 33.- Espectros U.V. de la Cefprozil a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$, degradada con adición de Vanadio.

De nuevo, en los valores de pH 2-4, con la adición de V(IV), a tiempo inicial se manifiestan tres picos cromatográficos, tal como se observa en la adición de Cu(II), y cuatro picos después de 1 hora de hidrólisis, tal como se muestra en la figura 34. Los picos I y II, tienen tiempos de retención idénticos (5,8 y 7,1 min.) a los obtenidos en el cromatograma a pH 5 (figura 32) y cuyos espectros U.V. son así mismo similares, tal como se ponen de manifiesto en la figura 35. El pico III, por su parte con un tiempo de retención de 3,9 min., como ocurre en la adición de Cu(II) no se manifiesta ni en el cromatograma de la Ceftizoxima, ni en el de Ceftizoxima-VO a pH=5 y también disminuye su área con el tiempo de hidrólisis, tal como sucede con los picos I y II. El espectro U.V. del pico III se da también en la figura 35, donde se observa que es así mismo idéntico al del 7-ADCA (figura 10).

Por todo ello, se puede establecer que los picos cromatográficos I y II se corresponden con los isómeros del complejo Ceftizoxima-VO, lo que sucede en todos los valores de pH ensayados y el pico III que solo se manifiesta en los valores de pH 2-4 debe asignarse a la formación de un complejo 7-desmetil ADCA-VO.

Por su parte, el pico cromatográfico IV, con un tiempo de retención de 4,8 min., debe asignarse al producto de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-VO, como sucede a pH 5.

Si comparamos la respuesta cromatográfica del pico de tiempo de retención 7,1 min., asignado a un isómero del complejo Ceftizoxima-VO, frente al pico de tiempo de retención 4,8 min., asignado a su producto de hidrólisis, vemos como mientras que la concentración del complejo disminuye con el tiempo, en proporción similar, aumenta la de su producto de hidrólisis, como se muestra en la figura 36.

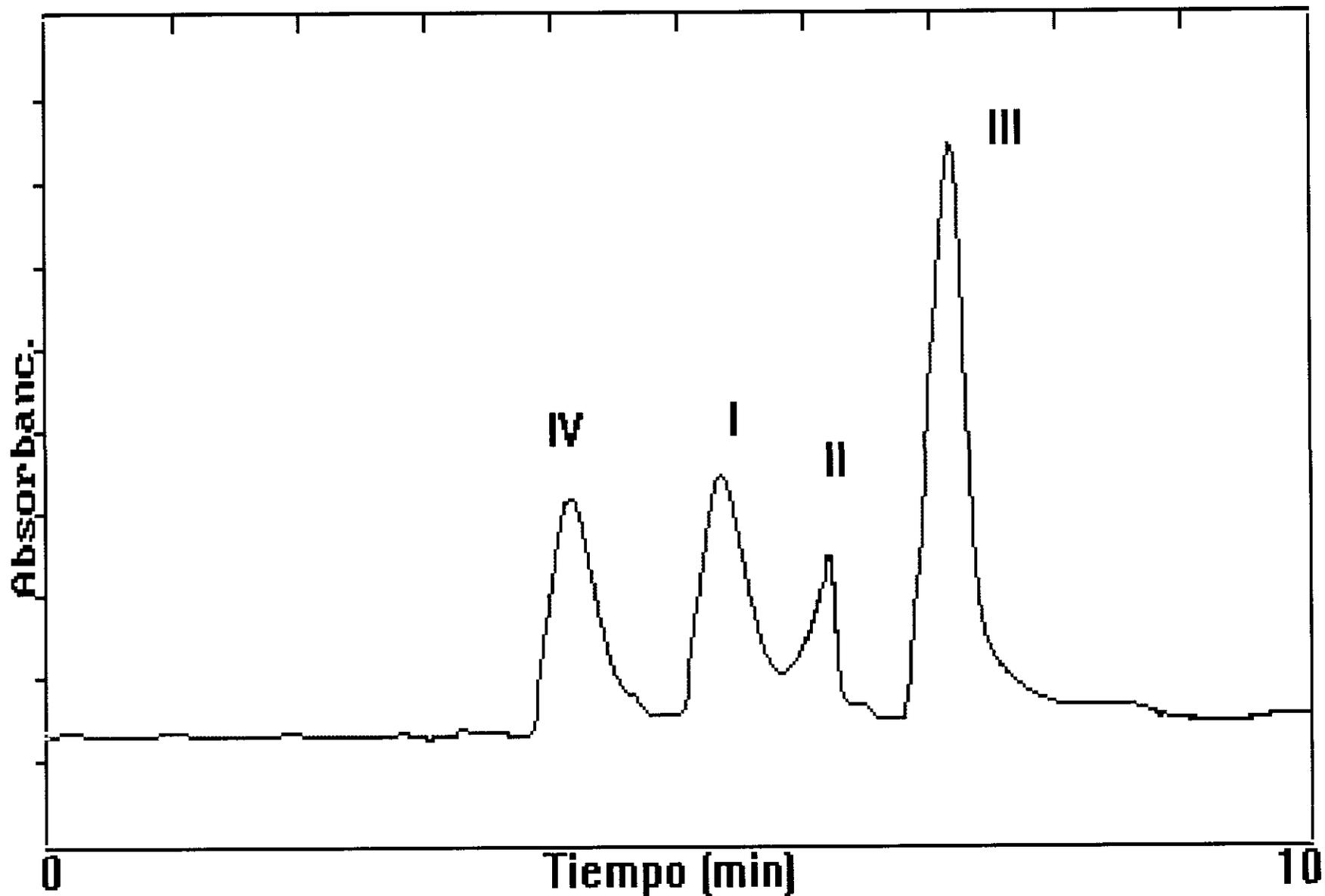


Figura 34.- Cromatograma de la Cefprozim a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=4$, degradada con adición de Vanadio. I. $\text{tr}=4,8\text{ min}$. II. $\text{tr}=5,8\text{ min}$. III. $\text{tr}=7,1\text{ min}$. IV. $\text{tr}=3,9\text{ min}$.

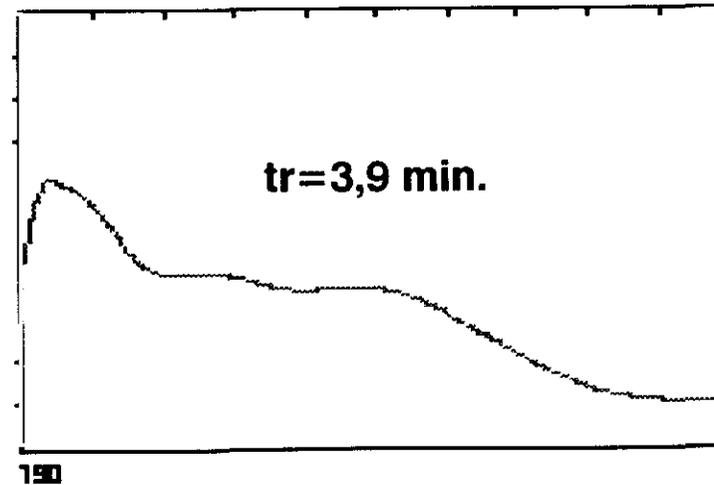
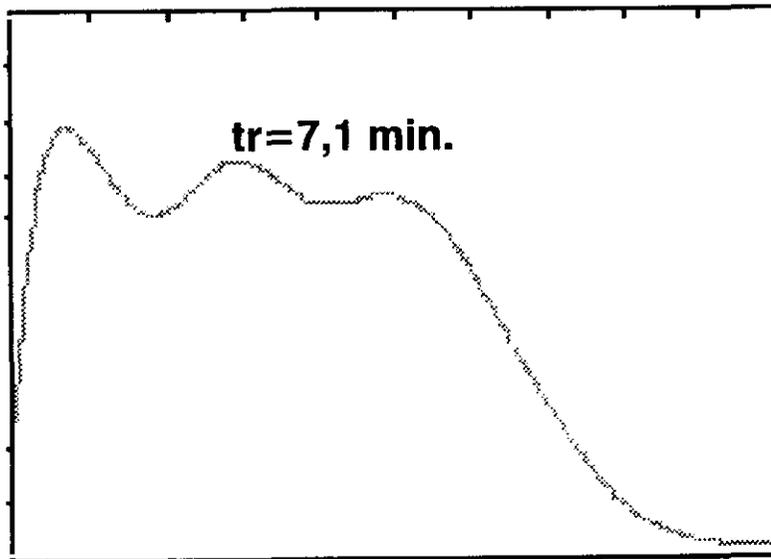
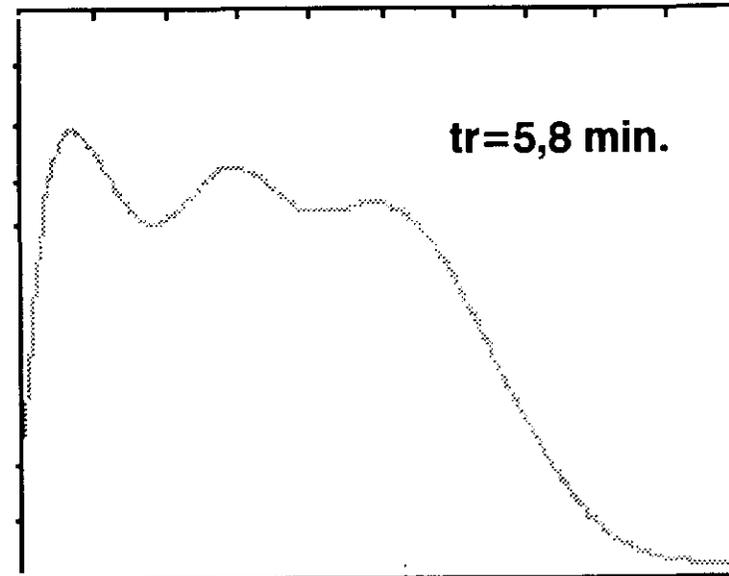
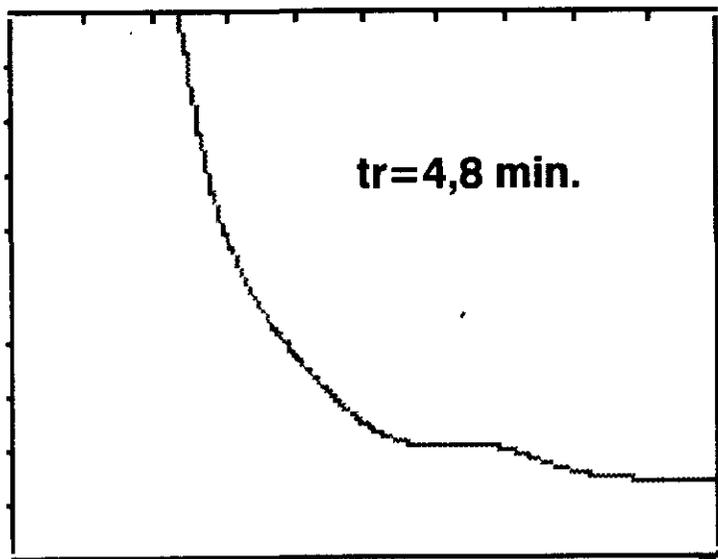


Figura 35.- Espectros U.V. de la Cefprozil a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=4$, degradada con adición de Vanadio.

pH=3. T=30 °C

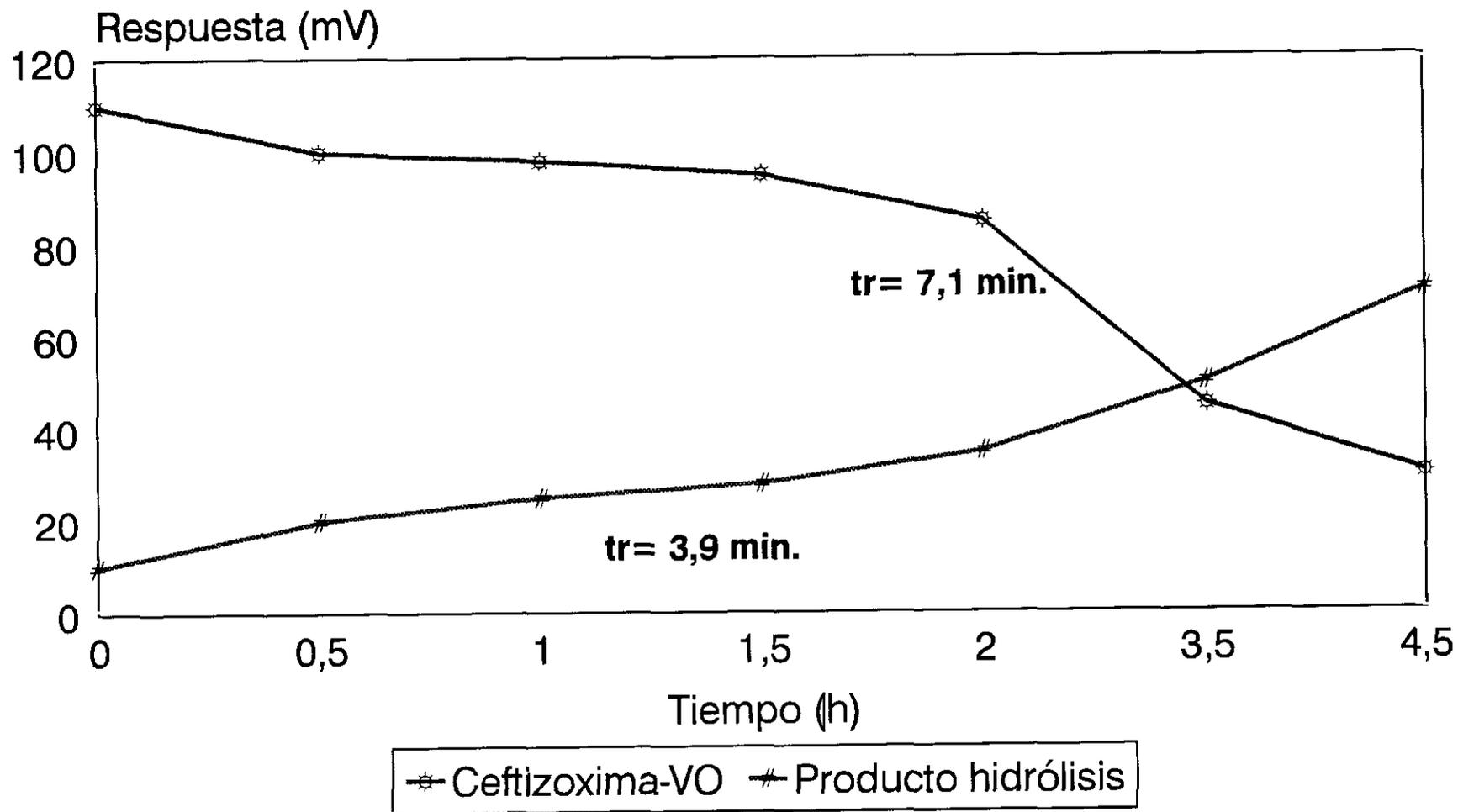


Figura 36.- Comparación de la respuesta cromatográfica entre el complejo de Vanadio y su producto de degradación.

El mecanismo de hidrólisis propuesto para el complejo Ceftizoxima-VO, es consecuentemente idéntico al del complejo con Cu(II), por tanto debe corresponderse al mecanismo hidrolítico que mostramos en la figura 37 a pH 5 y en la figura 38 a pH 2-4.

Estequiometría del complejo

La estequiometría propuesta (1:1) del complejo Ceftizoxima-Me, en los mecanismos de reacción de las figuras 28 y 30 (Ceftizoxima-Cu, $t_r=8,14$ min.) y 37-38 (Ceftizoxima-VO, $t_r=7,1$ min.), pueden determinarse experimentalmente por nuestro método cromatográfico, representando la respuesta cromatográfica de los picos correspondientes a los complejos frente a las distintas relaciones estequiométricas, tal como se muestran en las figuras 39 a 42, en los valores de pH ensayados (pH=2-5) respectivamente. En todas las gráficas, se observa un punto de inflexión en las relación 1:1, que corresponde a la estequiometría del complejo, tal como se propuso.

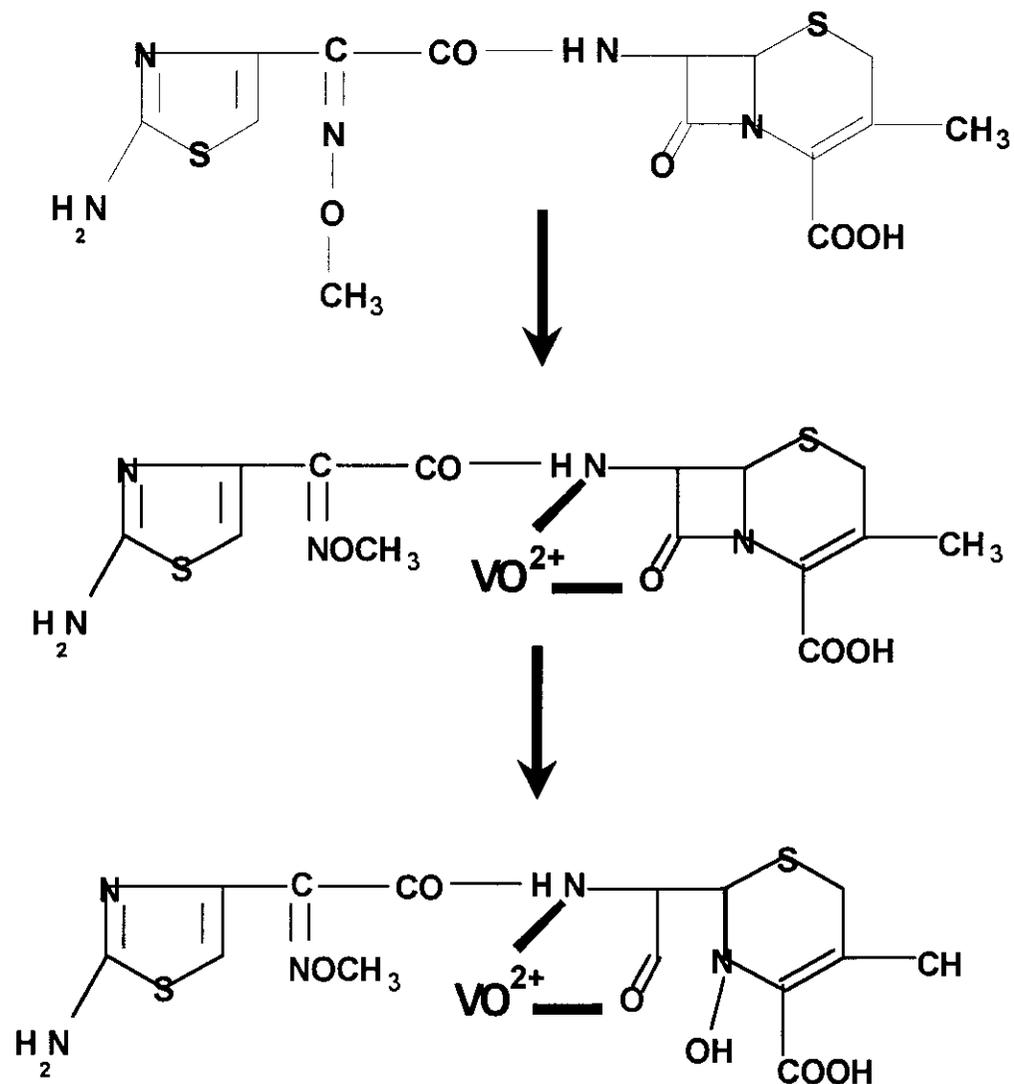


Figura 37 .- Mecanismo de reacción hidrolítico de la Ceftizoxima con adición de VO a pH=5.

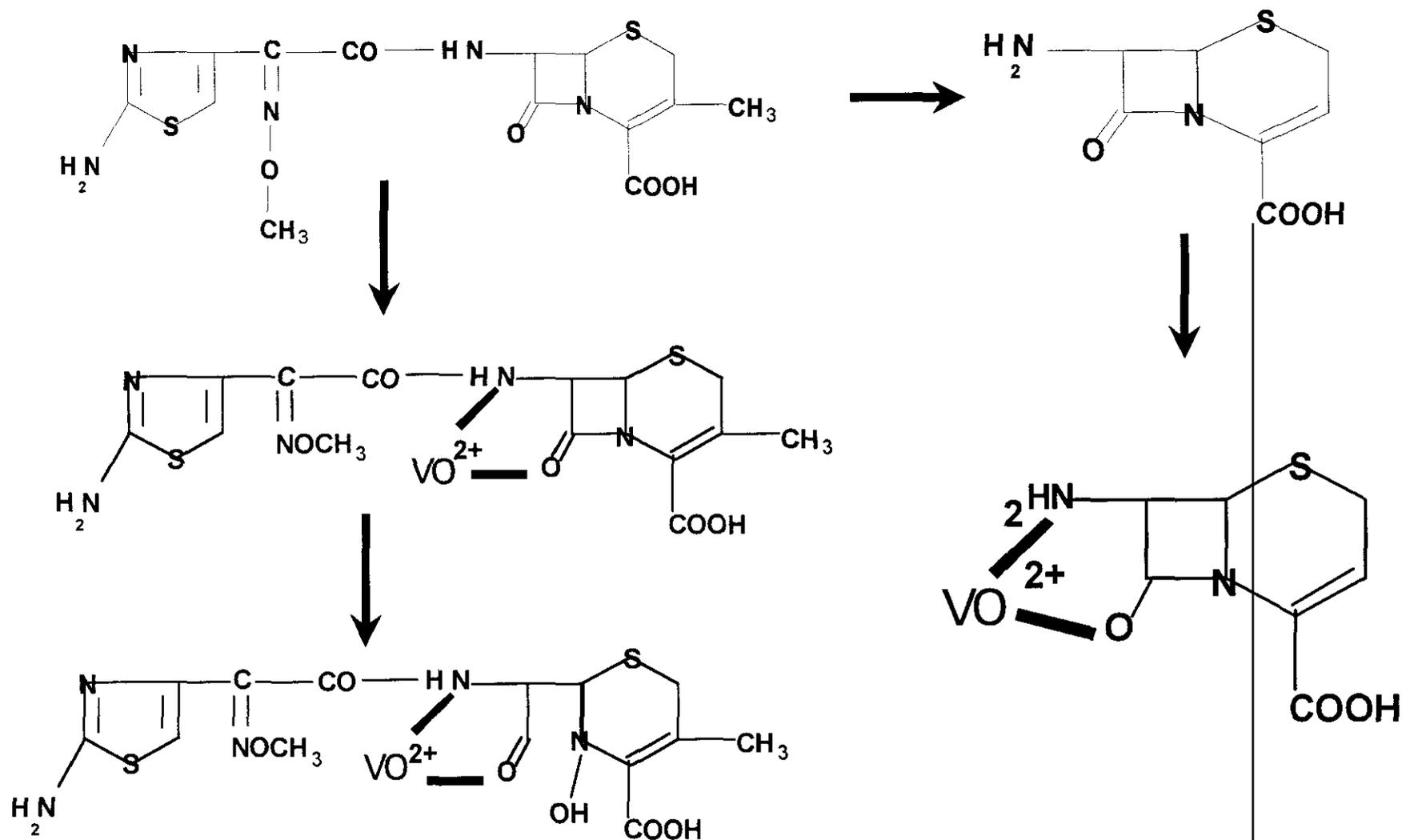


Figura 38 .- Mecanismo de reacción hidrolítico de la Cefprozil con adición de VO a pH=2-4.

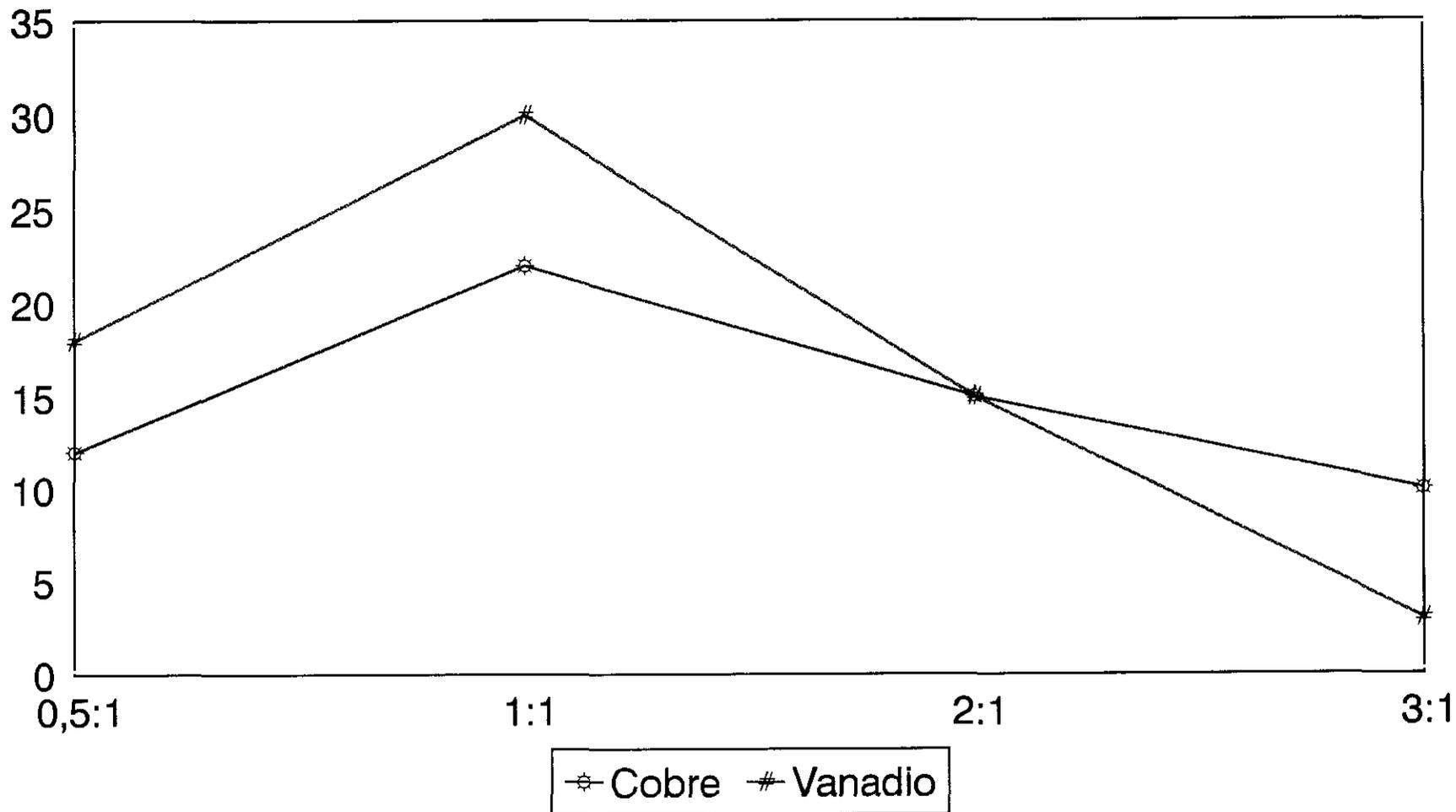


Figura 39.- Determinación de la estequiometría de los complejos Ceftizoxima-Cu y Ceftizoxima-VO a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=2$.

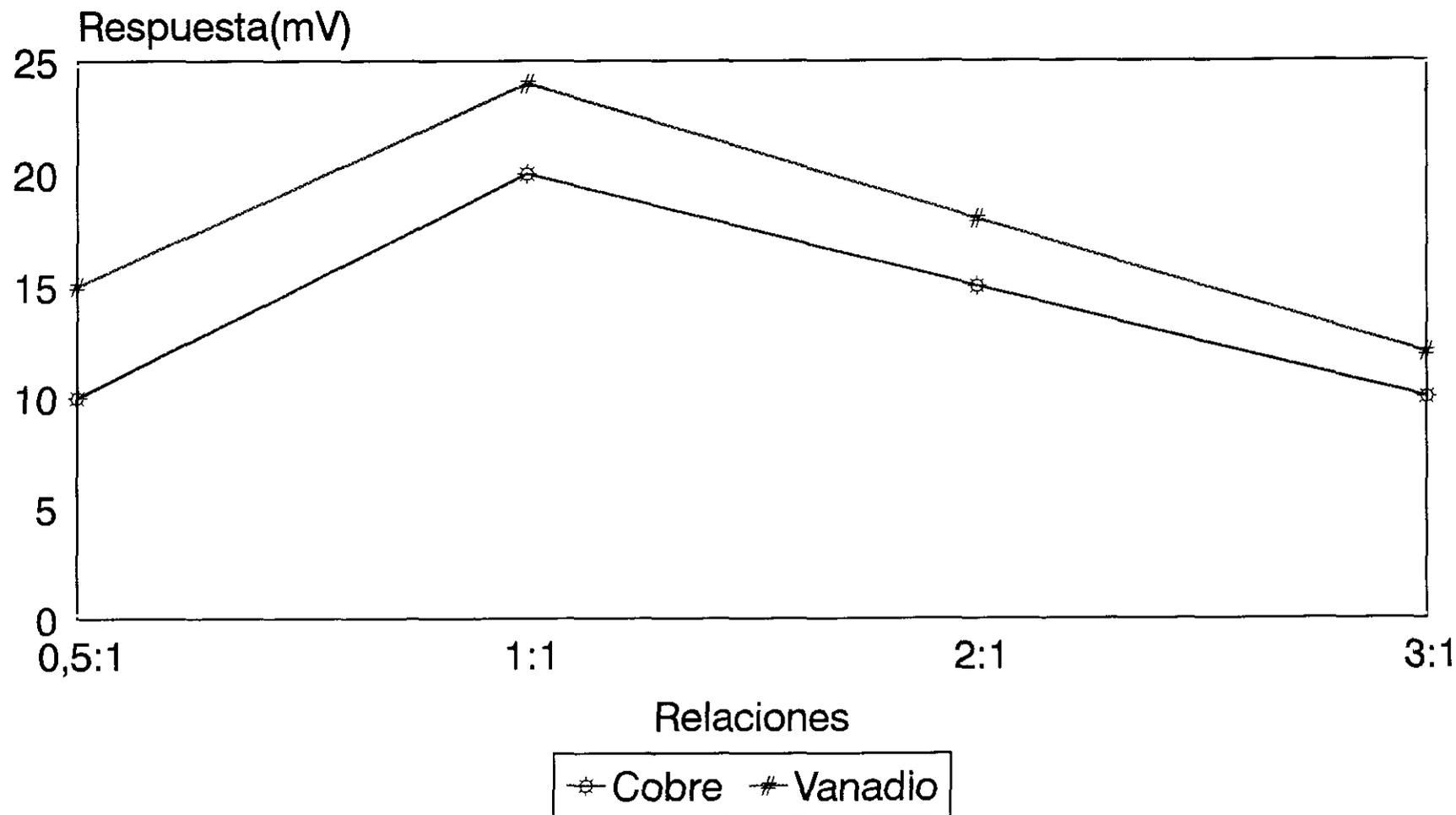


Figura 40.- Determinación de la estequiometría de los complejos Cefprozima-Cu y Cefprozima-VO a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=3$.

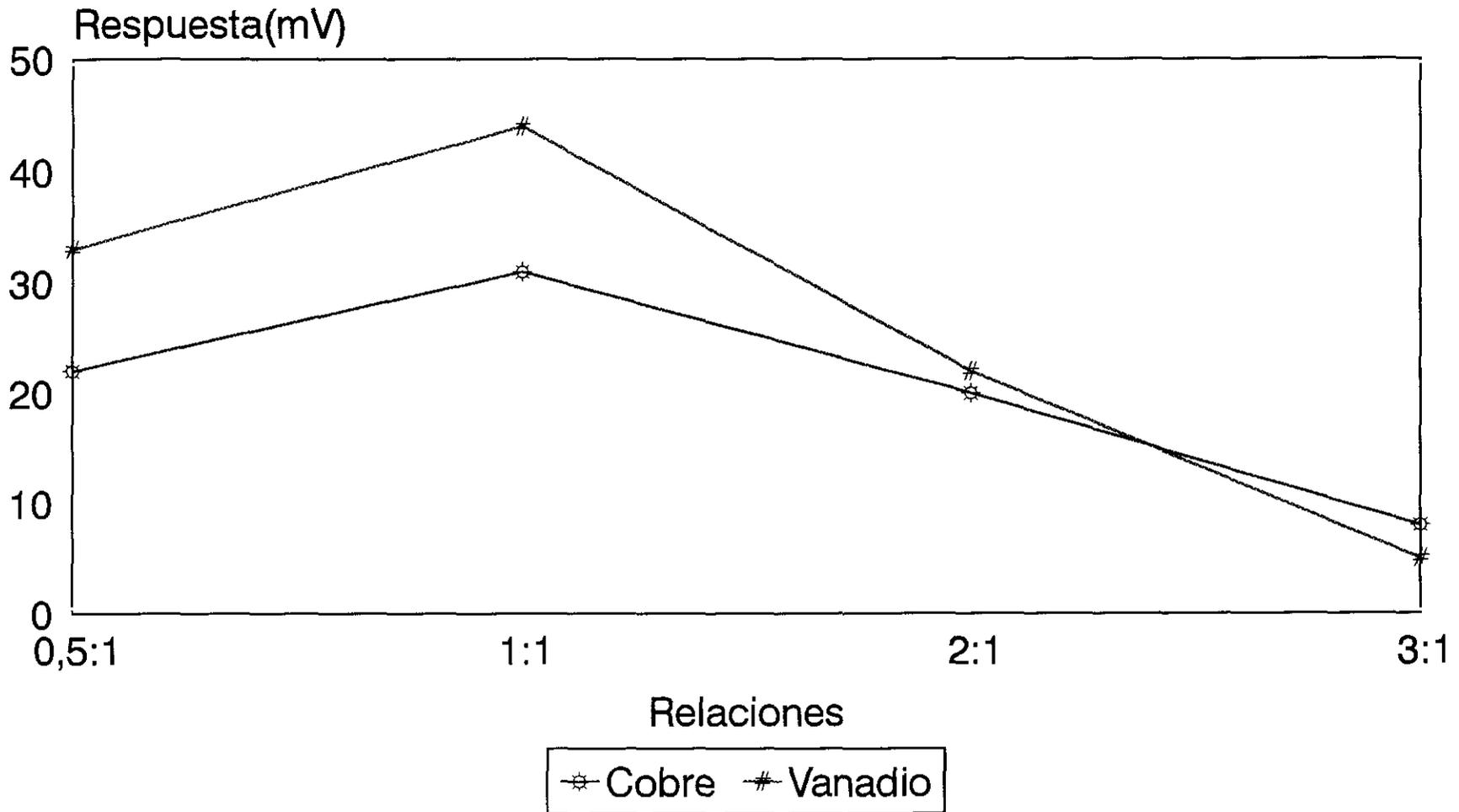


Figura 41.- Determinación de la estequiometría de los complejos Ceftizoxima-Cu y Ceftizoxima-VO a T=30 °C y pH=4.

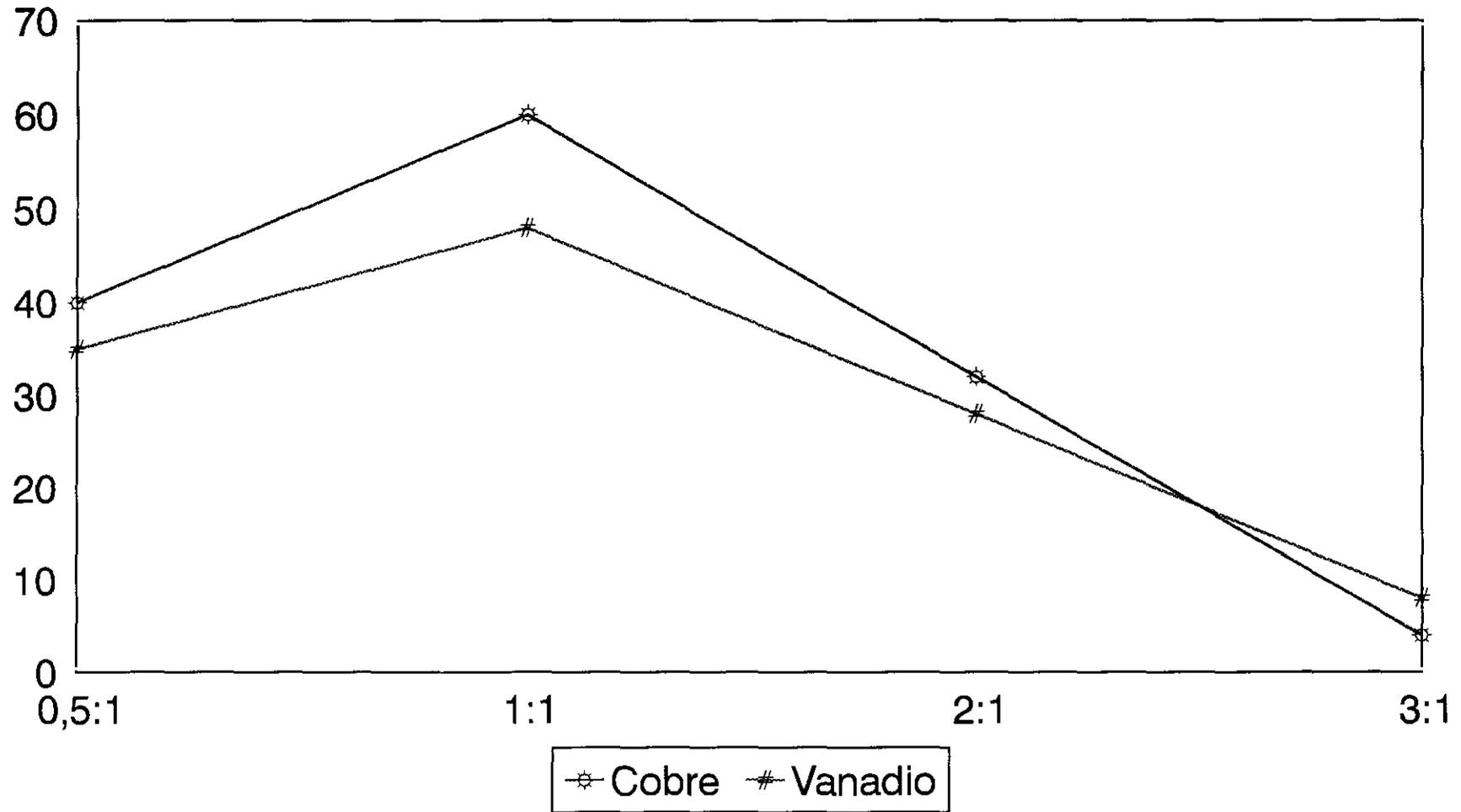


Figura 42.- Determinación de la estequiometría de los complejos Ceftizoxima-Cu y Ceftizoxima-VO a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$.

Adición de Níquel

Cuando se adiciona Ni(II) a la Cefprozima sódica, se observan cromatogramas idénticos a los obtenidos con la Cefprozima sin adición de metales, tanto a tiempo inicial, como cuando se hidroliza, tal como se muestra en las figuras 43 y 44. En la primera figura, se pueden apreciar dos picos cromatográficos (I y II) con tiempos de retención 1,43 y 1,66 min., respectivamente, que se corresponden con los dos isómeros de la Cefprozima, mientras que en la segunda, se manifiesta un tercer pico (III), con tiempo de retención de 1,16 min., que es idéntico al obtenido con la Cefprozima sin adición de metales y que atribuimos a la presencia del 7-desmetil ADCA.

Por todo ello, se puede establecer, que el mecanismo de la reacción de hidrólisis correspondiente a la Cefprozima con adición de Ni(II), es idéntico al de la Cefprozima sin adición, tal como mostramos en la figura 12.

Por otra parte, es de destacar que en ningún instante de la reacción de hidrólisis hay formación de complejo metálico, ya que no se observa pico cromatográfico alguno que pueda ser asignado a un complejo Cefprozima-Ni.

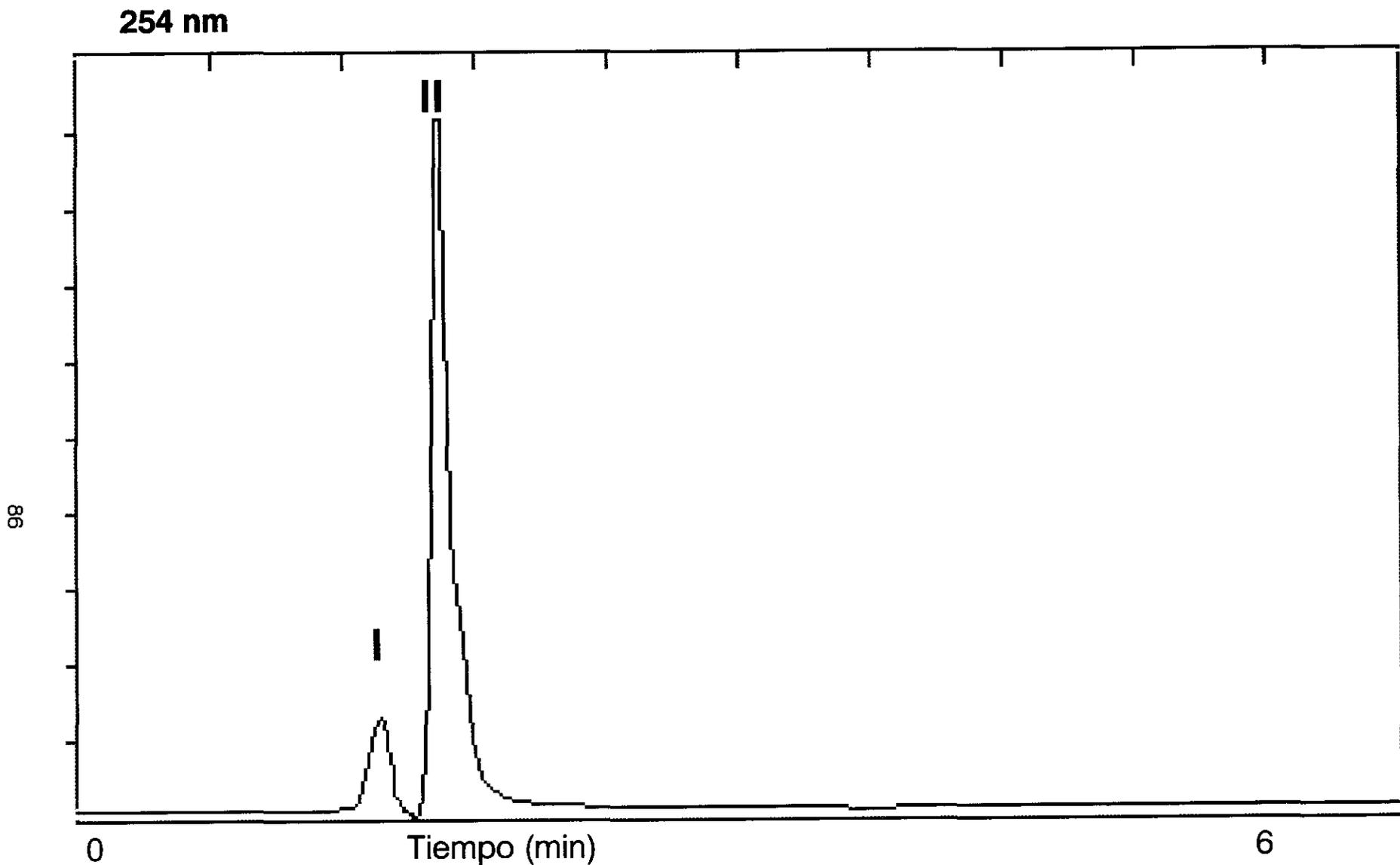


Figura 43.- Cromatograma de la Cefprozil con adición de Ni a T=30 °C y pH=5, a tiempo inicial. I. tr=1,43 min. II. tr=1,66 min.

254 nm

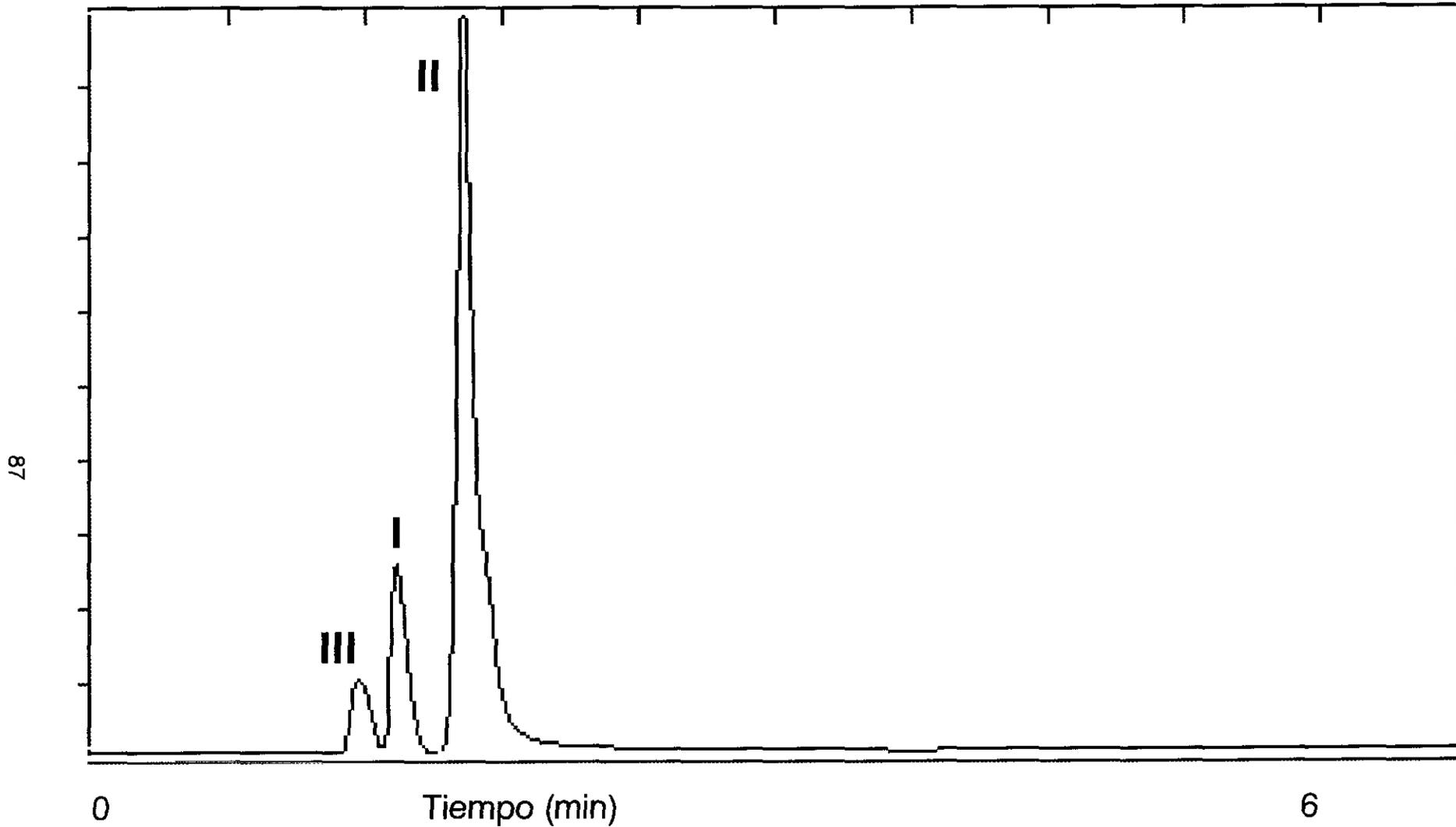


Figura 44.- Cromatograma de la Ceftrizoxima con adición de Ni a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=5$, degradada. I. $\text{tr}=1,43\text{ min}$. II. $\text{tr}=1,66\text{ min}$. III. $\text{tr}= 1,16\text{ min}$.

REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Ceftizoxima

La reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima, como hemos establecido anteriormente, conduce a la formación de 7-desmetil ADCA y ácido tiazoxímico, según la reacción :



Las constantes de esta reacción, pueden ser establecidas, a partir de los datos obtenidos de las integraciones de las áreas cromatográficas, realizadas con el programa D 450 v 2.0 de Kontron.

Si consideramos el área cromatográfica del pico de Ceftizoxima a tiempo inicial como el 100 % de Concentración y, representamos los datos obtenidos de las integraciones de las áreas (expresadas en concentración) del pico de $t_r = 1,66$ min. con respecto al tiempo de hidrólisis, obtenemos los valores de las pendientes y las ordenadas en el origen de las correspondientes rectas de regresión lineal, en los valores de pH de nuestro ensayo (2-8) y con las variaciones de Temperaturas efectuadas (30, 40 , 50 y 60 °C), tal como se muestran en las Tablas I (pendientes) y II (ordenadas en el origen).

Tabla I.- Pendientes de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH	T=30°C	T=40°C	T=50°C	T=60°C
2	-12,06	-13,32	-14,46	-17,25
3	-7,488	-9,274	-10,93	-14,92
4	-4,002	-6,237	-11,23	-13,35
5	-6,389	-8,318	-10,11	-14,43
6	-4,315	-6,392	-8,339	-13,01
7	-2,256	-4,631	-6,866	-12,21
8	-1,791	-4,244	-6,555	-12,07

Tabla II.- Ordenadas en el origen de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH	T=30°C	T=40°C	T=50°C	T=60°C
2	100,8	100,6	99,75	99,01
3	99,49	99,71	99,18	99,36
4	100,1	100,7	105,8	101,4
5	99,8	100,1	99,67	100,1
6	95,68	96,14	95,88	96,66
7	98,7	99,31	99,15	100,3
8	99,73	100,4	100,3	101,5

Orden de la Reacción

Para el cálculo de las constantes cinéticas, resulta necesario en primer lugar, establecer el orden de la reacción de hidrólisis, lo que se puede efectuar mediante la comparación entre los coeficientes de regresión lineal R , de las rectas de regresión obtenidas en la representación de C (orden 0), $\log C$ (orden 1) y $1/C$ (orden 2) frente al tiempo. Los resultados obtenidos, se muestran en las Tablas III ($T=30^{\circ}\text{C}$), IV ($T=40^{\circ}\text{C}$), V ($T=50^{\circ}\text{C}$) y VI ($T=60^{\circ}\text{C}$), donde se observan valores similares en los tres ordenes, pero con una mejor correlación en casi todos los casos para el orden uno. Esto nos hace asignar un orden uno a la reacción de hidrólisis de la Cefprozima, aunque pueda transcurrir en realidad, dentro de un pseudo orden uno, como ocurre con la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. En cualquier caso, es correcta la determinación de las constantes observadas de orden uno, como a continuación describimos.

Influencia del pH

En este tipo de ensayos, hemos mantenido constante la temperatura y fuerza iónica del tampón, variando solo el pH.

Si representamos gráficamente las rectas de regresión lineal obtenidas con los valores del $\log C$ frente al tiempo, en los distintos valores de pH ensayados (2-8), manteniendo fija la temperatura, tal como se muestran en las figuras 45 a 30°C , 46 a 40°C , 47 a 50°C y 48 a 60°C , se manifiesta una menor pendiente para el pH 2, mientras que los mayores valores de esta, se corresponden con los de pH 7 y 8, lo que indica una mayor degradación a pH 2 y una menor a pH 7—8.

Tabla III.- Coeficientes de Regresión lineal a T=30 °C.

T=30 °C

pH	ORDEN 0	ORDEN 1	ORDEN 2
2	-0,996	-0,988	0,972
3	-0,997	-0,999	0,997
4	-0,895	-0,894	0,892
5	-0,987	-0,991	0,991
6	-0,921	-0,928	0,934
7	-0,951	-0,953	0,955
8	-0,963	-0,964	0,966

Tabla IV.- Coeficientes de Regresión lineal a T=40 °C.

T=40 °C

pH	ORDEN 0	ORDEN 1	ORDEN 2
2	-0,999	-0,991	0,971
3	-0,998	-0,999	0,995
4	-0,946	-0,948	0,951
5	-0,994	-0,996	0,996
6	-0,973	-0,981	0,984
7	-0,995	-0,997	0,997
8	-0,994	-0,995	0,995

Tabla V.- Coeficientes de Regresión lineal a T=50 °C.

T=50 °C

pH	ORDEN 0	ORDEN 1	ORDEN 2
2	-0,999	-0,992	0,969
3	-0,998	-0,999	0,993
4	-1,309	-0,975	0,911
5	-0,995	-0,998	0,996
6	-0,984	-0,992	0,995
7	-0,998	-0,999	0,998
8	-0,997	-0,998	0,997

Tabla VI.- Coeficientes de Regresión lineal a T=60 °C.

T=60 °C

pH	ORDEN 0	ORDEN 1	ORDEN 2
2	-0,999	-0,988	0,946
3	-0,998	-0,994	0,971
4	-0,988	-0,991	0,981
5	-0,998	-0,995	0,974
6	-0,996	-0,997	0,982
7	-0,999	-0,992	0,975
8	-0,998	-0,991	0,973

T=30 °C

93

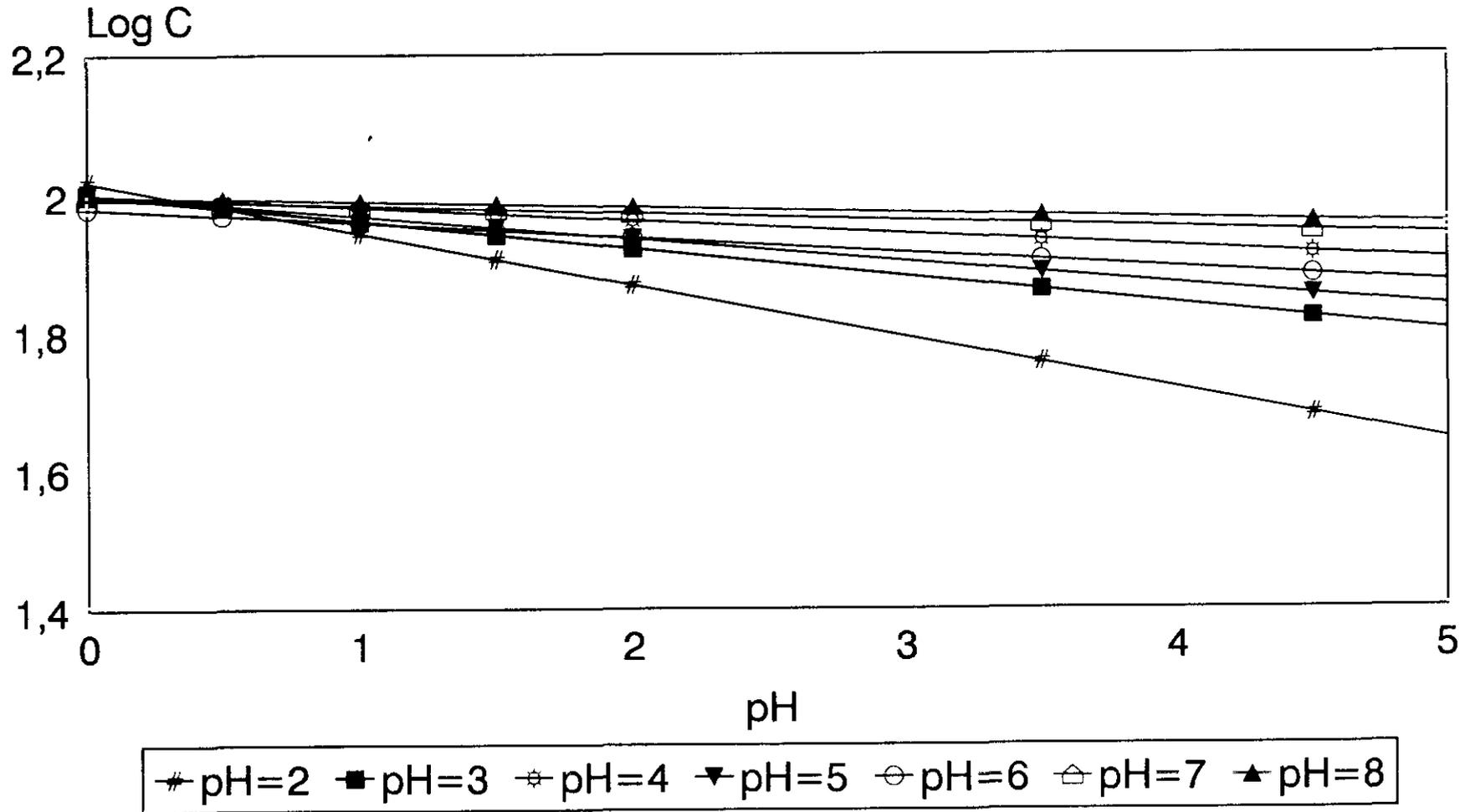


Figura 45.- Representación del Log C frente al tiempo, a diferentes valores de pH .

T=40 °C

94

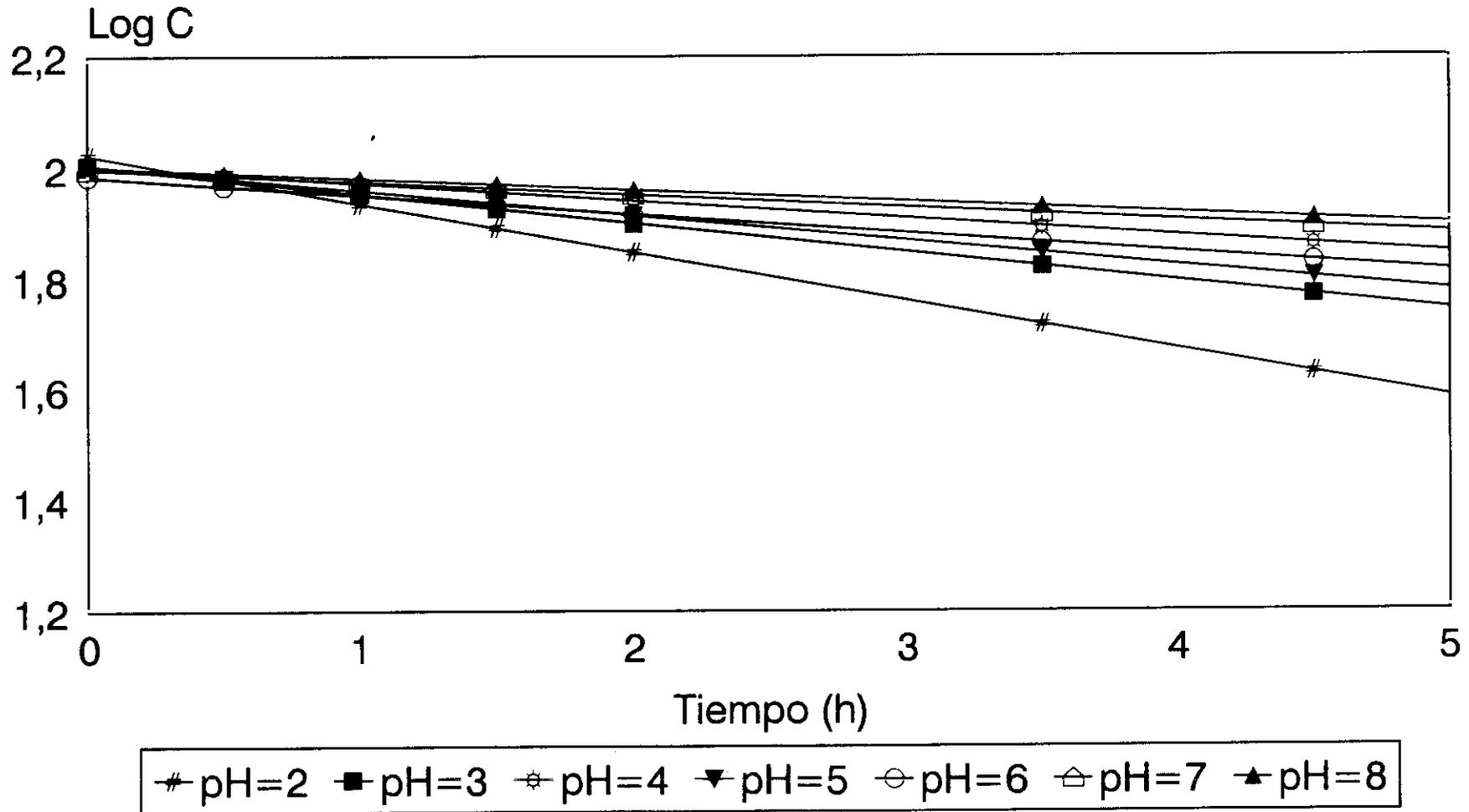


Figura 46.- Representación del Log C frente al tiempo, a diferentes valores de pH .

T=50 °C

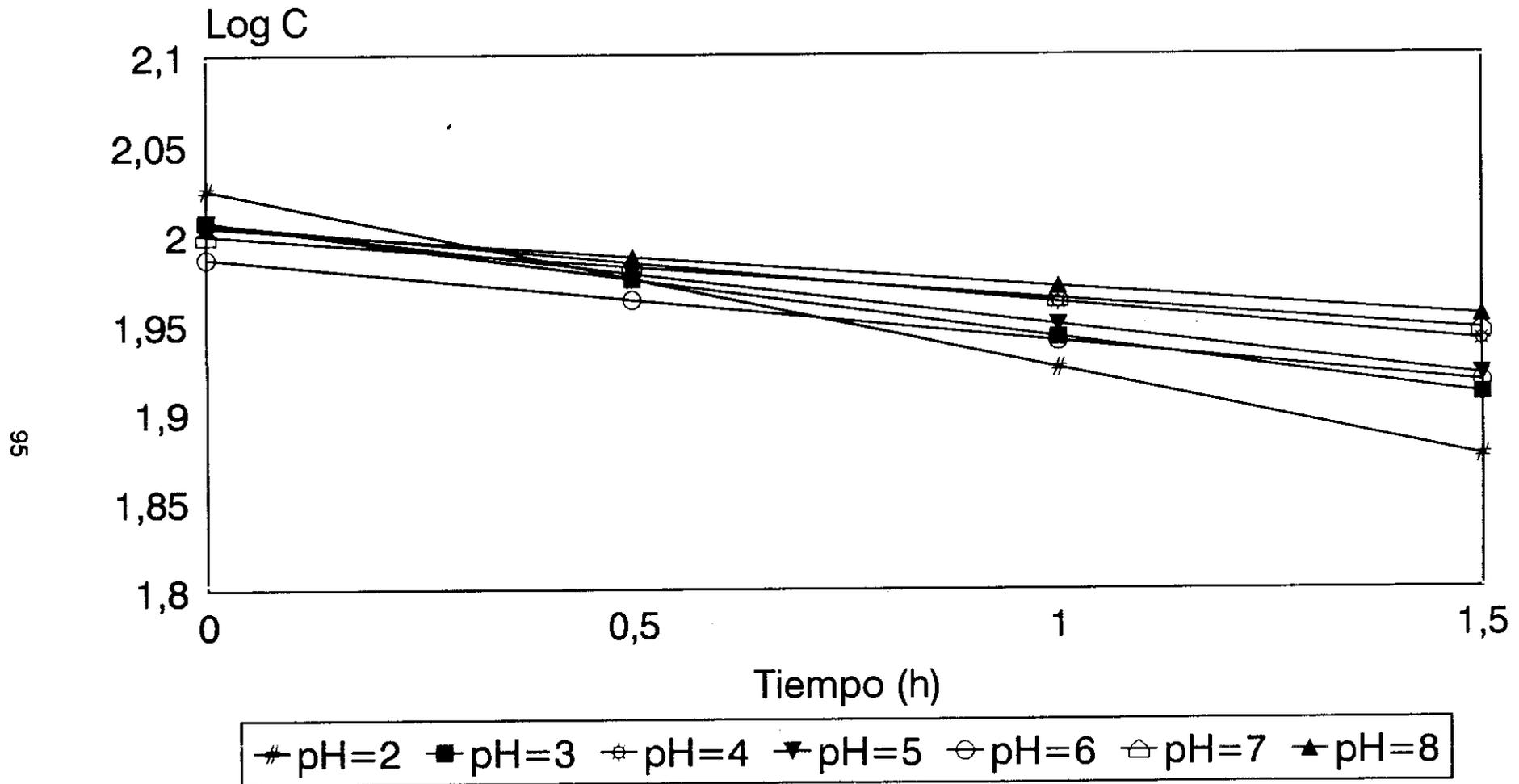


Figura 47.- Representación del Log C frente al tiempo, a diferentes valores de pH .

T=60 °C

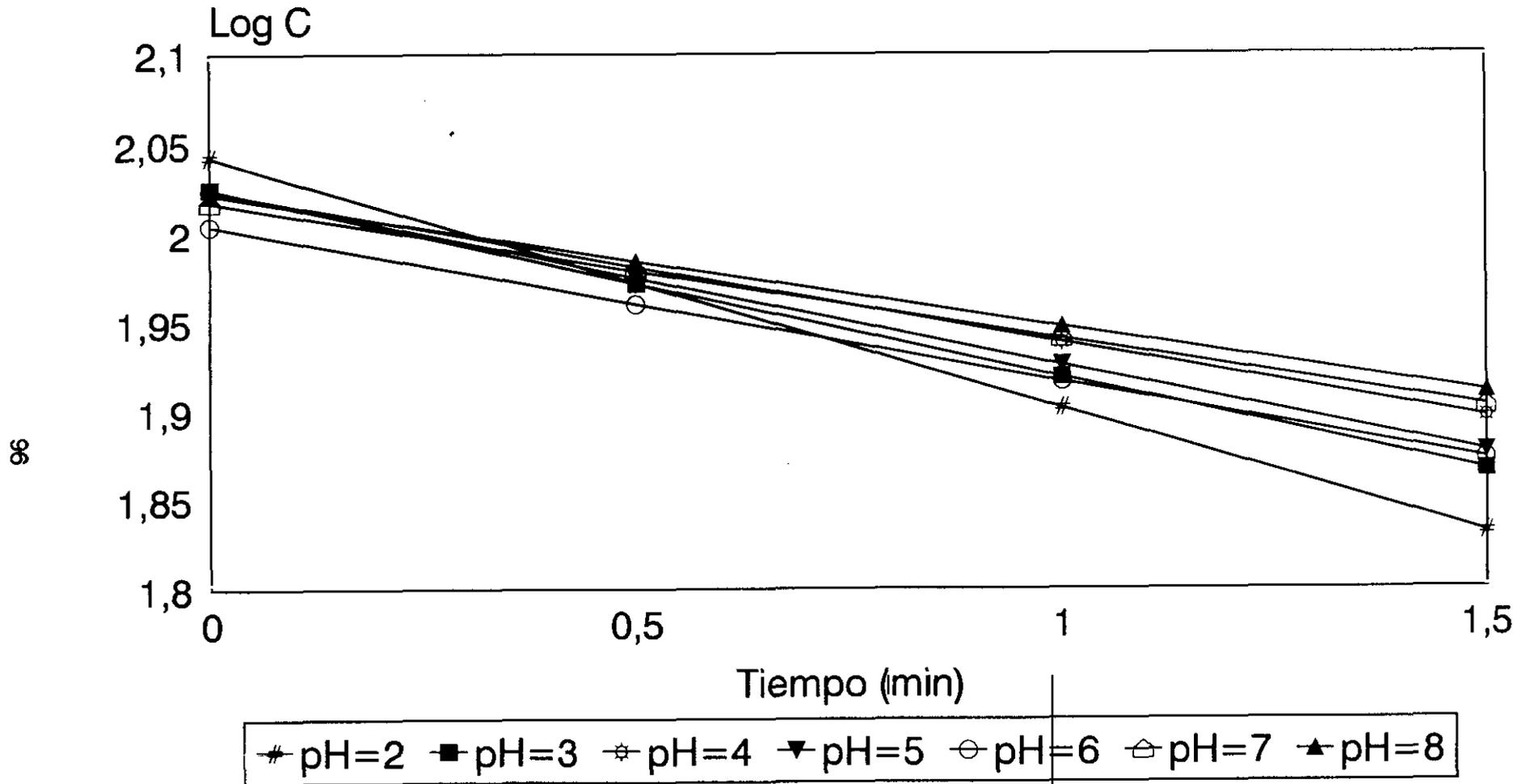


Figura 48.- Representación del Log C frente al tiempo, a diferentes valores de pH .

A partir de las pendientes de las rectas de regresión lineal de orden uno, calculamos los valores de las constantes observadas, tal como se muestra en la Tabla VII, donde se representan estas constantes en los valores de pH 2 a 8 y a las temperaturas ensayadas.

Tabla VII.- Constantes observadas de orden uno en la reacción de hidrólisis de la Cefprozil.

T °C	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8
30	0,172	0,091	0,044	0,075	0,05	0,024	0,019
40	0,201	0,119	0,072	0,103	0,078	0,052	0,047
50	0,231	0,15	0,102	0,133	0,108	0,083	0,077
60	0,324	0,243	0,195	0,227	0,201	0,176	0,171

La representación del log de las K observadas frente a los valores de pH ensayados, nos da como resultado la gráfica de la figura 49, en donde se pueden apreciar dos puntos de inflexión, dentro de una curva característica de una reacción de hidrólisis. Según se deduce de la gráfica, la degradación es máxima en los valores de pH más ácidos (2-5), con un punto de inflexión a pH=4, donde la degradación de la Cefprozil es inferior al pH=5, una vez superado este último valor, la Cefprozil va disminuyendo su degradación conforme nos acercamos a los valores de pH alcalinos o neutros (7-8).

Por tanto se puede establecer, que la Cefprozil es menos estable a pH ácidos y más estable en valores de pH alcalino, con la característica singular del

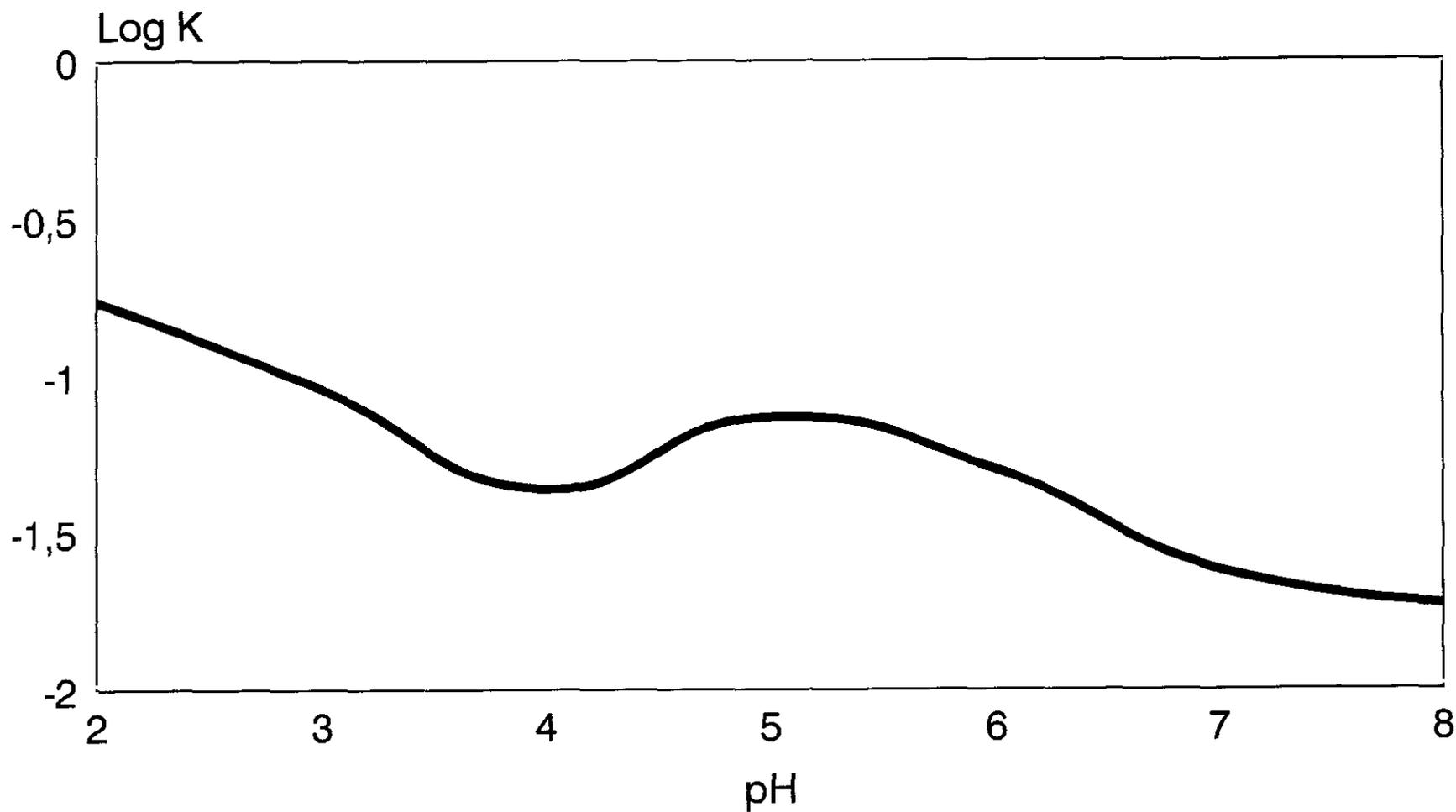


Figura 49.- Representación del $\log K$ obs. frente al pH a $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH=4, donde se observa una menor degradación, similar a la del pH=6, tal como se pone también de manifiesto al contrastar los valores de las constantes observadas de la reacción de orden uno, que dimos en la Tabla VII.

Influencia de la temperatura

Se ha mantenido para este ensayo, constantes el valor del pH y de la fuerza iónica del tampón.

Si representamos gráficamente el log C frente al tiempo, en los distintos valores de temperaturas, manteniendo fijo el pH en 2, obtenemos la representación de la figura 50, donde se manifiesta una menor pendiente en la recta correspondiente a la menor temperatura (30 °C), para ir incrementando según la aumentamos, lo que se corresponde a una lógica menor degradación en las temperaturas más bajas. En los demás valores de pH sucede lo mismo, por lo que no hemos creído necesario representarlos.

Las correspondientes rectas de regresión lineal obtenidas por la aplicación de la ecuación de Arrhenius, representando los logaritmos de las constantes de velocidad de primer orden frente a 1/T, se muestran en la figura 51, en los distintos valores de pH, mientras que las Energías de Activación, obtenidas según la ecuación:

$$E_a = 2,303 \times R \times a$$

pH=2

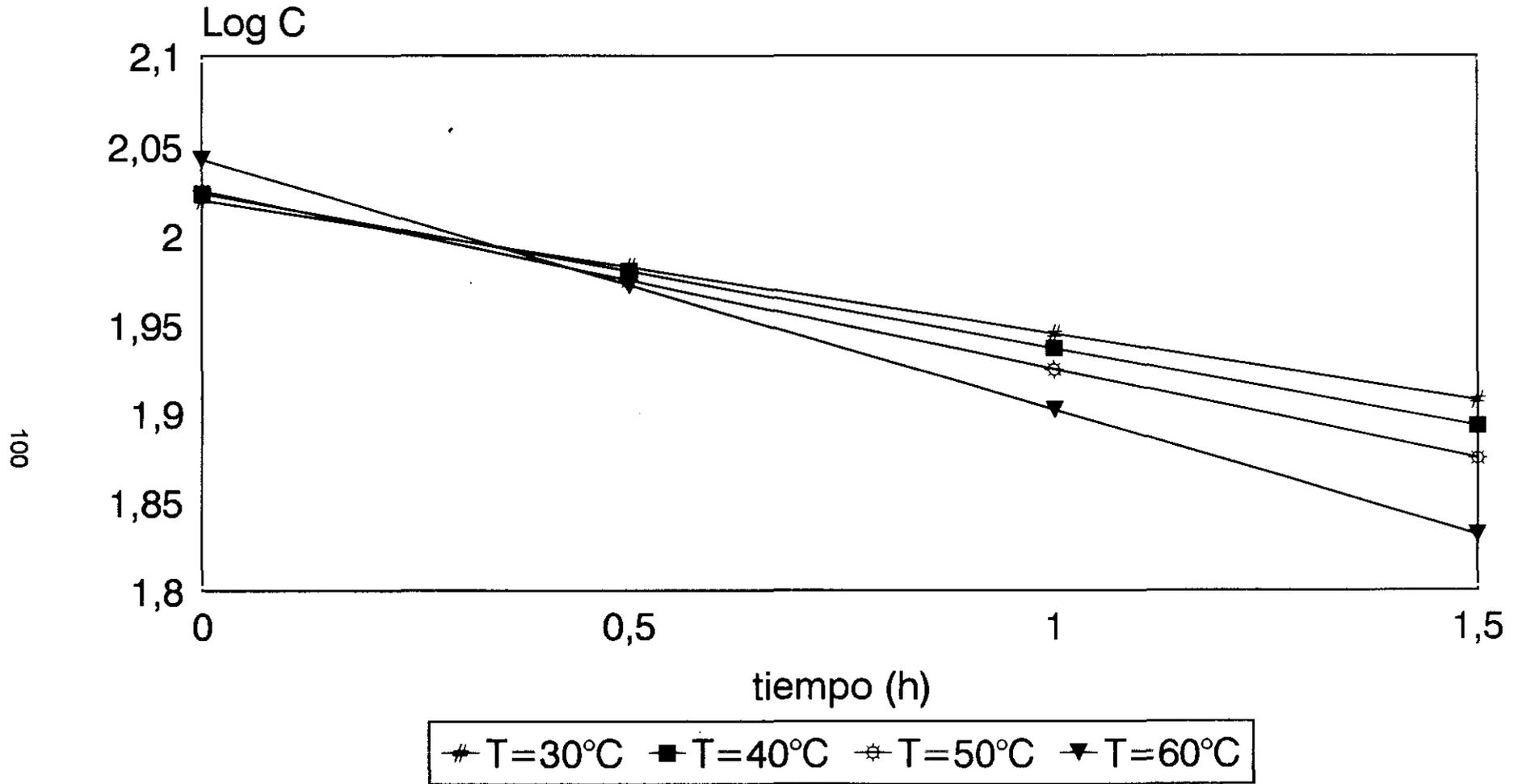


Figura 50.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes temperaturas.

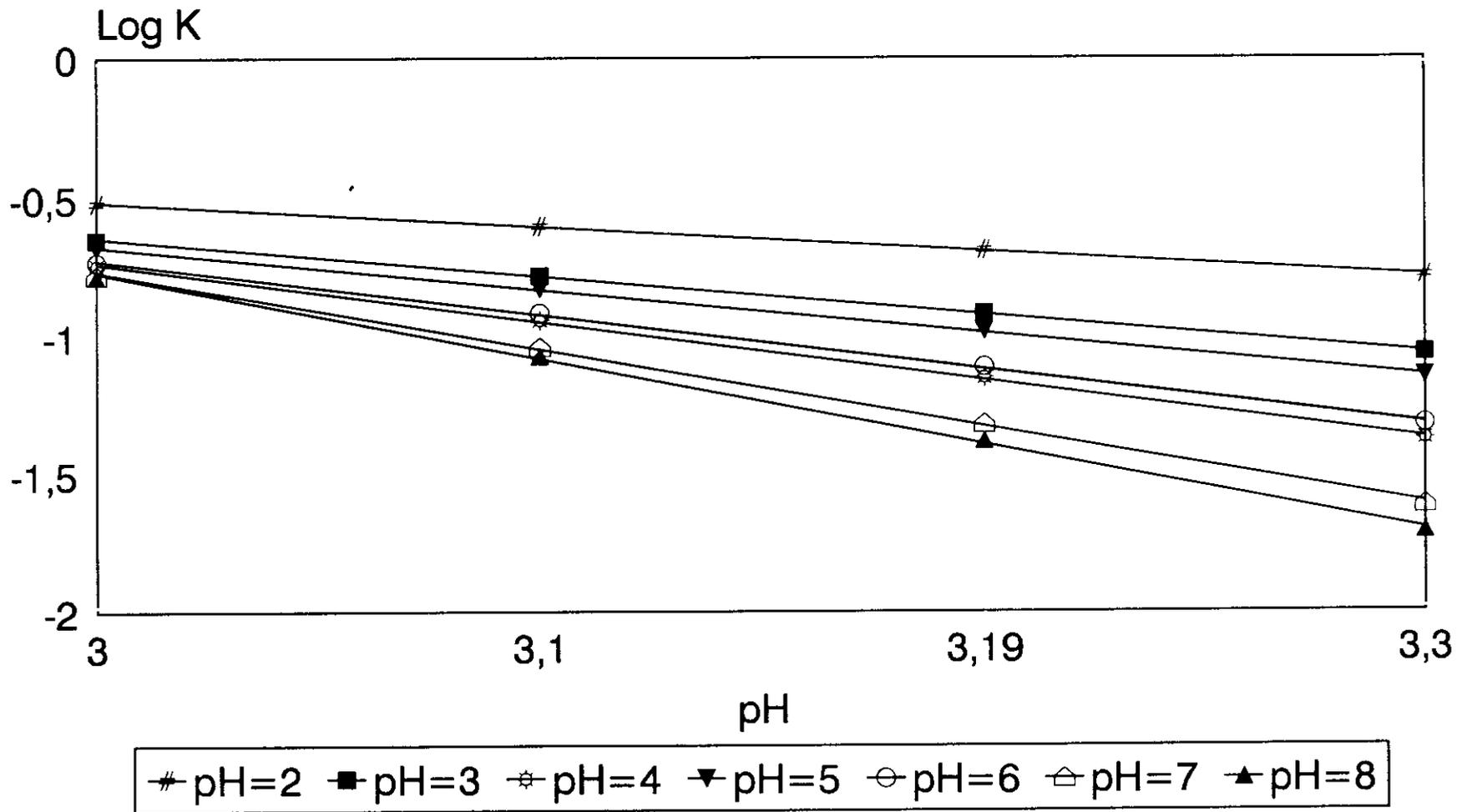


Figura 51.- Representación de Arrhenius.

donde a es la pendiente de la recta de regresión lineal de Arrhenius, se dan en la Tabla VIII.

Tabla VIII.- Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (kcal/mol).

pH	Ea
2	4,06
3	6,32
4	9,71
5	7,15
6	9,07
7	12,9
8	14,32

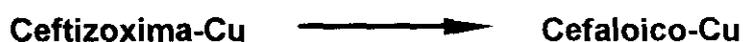
En ella se observa altos valores de la Energía de Activación de Arrhenius, siguiendo un orden de pH:

$$\text{pH } 2 < 3 < 5 < 6 < 4 < 7 < 8$$

que resulta inverso al de la velocidad de la reacción de hidrólisis (ver figura 49), como es lógico, ya que una menor Energía de Activación significa un salto menor de Energía que hay que vencer para que se produzca la reacción, lo que equivale a la posibilidad de una mayor degradación.

Ceftizoxima-Cu

Como hemos establecido anteriormente, el mecanismo de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-Cu, implica la ruptura del anillo β -lactama, con la formación de otro complejo, el del correspondiente derivado Cefaloico-Cu(II), según el siguiente esquema:



Esta reacción hidrolítica, se produce por el ion hidroxilo o bien por una molécula de agua, siendo esta última reacción espontánea. El Cu(II) unido al anillo β -lactama cataliza estas reacciones, predominando en nuestro caso la catálisis acuosa, ya que hemos operado a pH ácido.

Las constantes cinéticas, en este caso, se han determinado a partir de las áreas cromatográficas del pico de tiempo de retención 8,14 min., que se corresponde con el isómero mayoritario del complejo Ceftizoxima-Cu, en los valores de pH, temperaturas y relaciones molares establecidas en nuestro ensayo. En las Tablas IX a XII, se muestran los valores de las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas con los valores de concentración, en %, con respecto al tiempo de hidrólisis, en los valores de pH 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

Orden de la reacción

Como en la reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima, el orden en ésta, debe corresponderse con un pseudo orden uno, ya que los coeficientes de regresión lineal son semejantes tanto en orden cero, como para los ordenes uno y dos, tal

como se muestra en las Tablas XIII a XVI, en los valores de pH 2, 3, 4 y 5 respectivamente, por lo que las constantes cinéticas que hemos determinado han sido las de orden uno.

Tabla IX.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=2

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,97	-1,48	-3	-4,5
b	100,51	99,25	97,88	95,6
40	-2,71	-3,21	-4,05	-4,89
	100,88	99,69	97,71	95,72
50	-3,98	-4,45	-5,22	-6
	101,12	99,92	97,92	95,93
60	-9,03	-9,35	-9,88	-10,42
	101,47	100,26	98,24	96,23

Tabla X.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=3

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-3,37	-3,86	-4,66	-5,47
b	102,03	100,81	98,77	96,73
40	-5,01	-5,44	-6,17	-6,9
	102,37	101,13	99,07	97,02
50	-6,16	-6,56	-7,24	-7,91
	102,52	101,28	99,22	97,15
60	-10,75	-11,02	-11,47	-11,92
	102,53	101,29	99,23	97,16

Tabla XI.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=4

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-3,67	-3,95	-4,76	-5,56
b	101,69	100,12	98,12	96,11
40	-5,08	-5,52	-6,24	-6,97
	101,65	100,43	98,41	96,39
50	-6,22	-6,62	-7,29	-7,96
	101,8	100,58	98,55	96,52
60	-10,75	-11,02	-11,47	-11,92
	101,79	100,57	98,54	96,51

Tabla XII.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=5

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-5,93	-6,34	-7,9	-9,07
b	101,68	100,47	99,6	95,97
40	-7,38	-7,75	-8,3	-10,24
	101,93	100,71	99	96,14
50	-8,41	-8,75	-9,2	-11,06
	102,02	100,8	99,17	96,18
60	-12,48	-12,7	-12,5	-14,32
	101,81	100,59	98,2	95,85

Tabla XIII.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=2

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,942	-0,933	-0,929	-0,898
b	-0,94	-0,935	-0,934	-0,91
c	0,938	0,936	0,939	0,922
40	-0,971	-0,987	-0,956	-0,913
	-0,967	-0,986	-0,963	-0,926
	0,963	0,985	0,969	0,938
50	-0,979	-0,991	-0,976	-0,944
	-0,974	-0,989	-0,981	-0,957
	0,969	0,986	0,984	0,967
60	-0,99	-0,994	-0,991	-0,98
	-0,978	-0,985	-0,99	-0,987
	0,962	0,97	0,979	0,983

Tabla XIV.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=3

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,922	-0,966	-0,974	-0,947
b	-0,922	-0,964	-0,976	-0,957
c	0,921	0,962	0,977	0,964
40	-0,959	-0,982	-0,988	-0,971
	-0,955	-0,979	-0,989	-0,98
	0,952	0,975	0,989	0,986
50	-0,968	-0,985	-0,991	-0,979
	-0,964	-0,981	-0,991	-0,986
	0,959	0,976	0,989	0,99
60	-0,99	-0,996	-0,997	-0,991
	-0,979	-0,986	-0,993	-0,994
	0,962	0,97	0,98	0,986

Tabla XV.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=4

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,954	-0,933	-0,94	-0,919
b	-0,952	-0,933	-0,944	-0,929
c	0,95	0,933	0,947	0,938
40	-0,948	-0,966	-0,969	-0,952
	-0,945	-0,964	-0,972	-0,962
	0,941	0,961	0,972	0,969
50	-0,96	-0,974	-0,976	-0,963
	-0,956	-0,97	-0,978	-0,973
	0,951	0,966	0,977	0,977
60	-0,987	-0,991	-0,991	-0,984
	-0,975	-0,982	-0,988	-0,989
	0,958	0,966	0,974	0,98

Tabla XVI.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=5

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,982	-0,993	-0,998	-0,974
b	-0,982	-0,993	-0,999	-0,987
c	0,981	0,992	0,998	0,995
40	-0,987	-0,995	-0,997	-0,981
	-0,986	-0,995	-0,998	-0,993
	0,983	0,993	0,994	0,999
50	-0,99	-0,996	-0,997	-0,984
	-0,988	-0,995	-0,999	-0,996
	0,983	0,991	0,998	0,999
60	-0,997	-0,999	-0,996	-0,989
	-0,99	-0,994	-0,996	-0,999
	0,974	0,979	0,984	0,99

Influencia del pH

En estos ensayos, hemos mantenido constantes la fuerza iónica del tampón, temperatura y relación molar.

En la representación gráfica de las rectas de regresión lineal obtenidas con los valores del log C frente al tiempo, en los distintos valores de pH ensayados (2-5), tal como se muestran en las figuras 52 a 30 °C, 53 a 40 °C, 54 a 50 °C y 55 a 60 °C, manteniendo fija la relación molar en 1:1, se manifiesta una menor pendiente para el pH 5, mientras que los mayores valores de esta, se corresponden con los del pH 2, lo que indica una mayor degradación a pH 5 y una menor a pH más ácidos.

Los correspondientes valores de las constantes observadas, se muestran en la Tabla XVII y en la XVIIb, donde se representan estas constantes en los valores de pH 2 a 5 y a las temperaturas ensayadas.

En ellas, se observan en general unos valores más elevados de las constantes observadas, conforme aumenta el valor del pH de 2 a 5, aunque la reacción de hidrólisis es más sostenida en el valor de pH 4, con valores próximos al pH 3, manifestándose de nuevo, como sucede en el caso de la Cefprozima, una estabilización de la reacción hidrolítica en ese pH.

Este comportamiento ocurre en todas las temperaturas y relaciones molares Me/Ceftizoxima ensayadas.

T = 30 °C

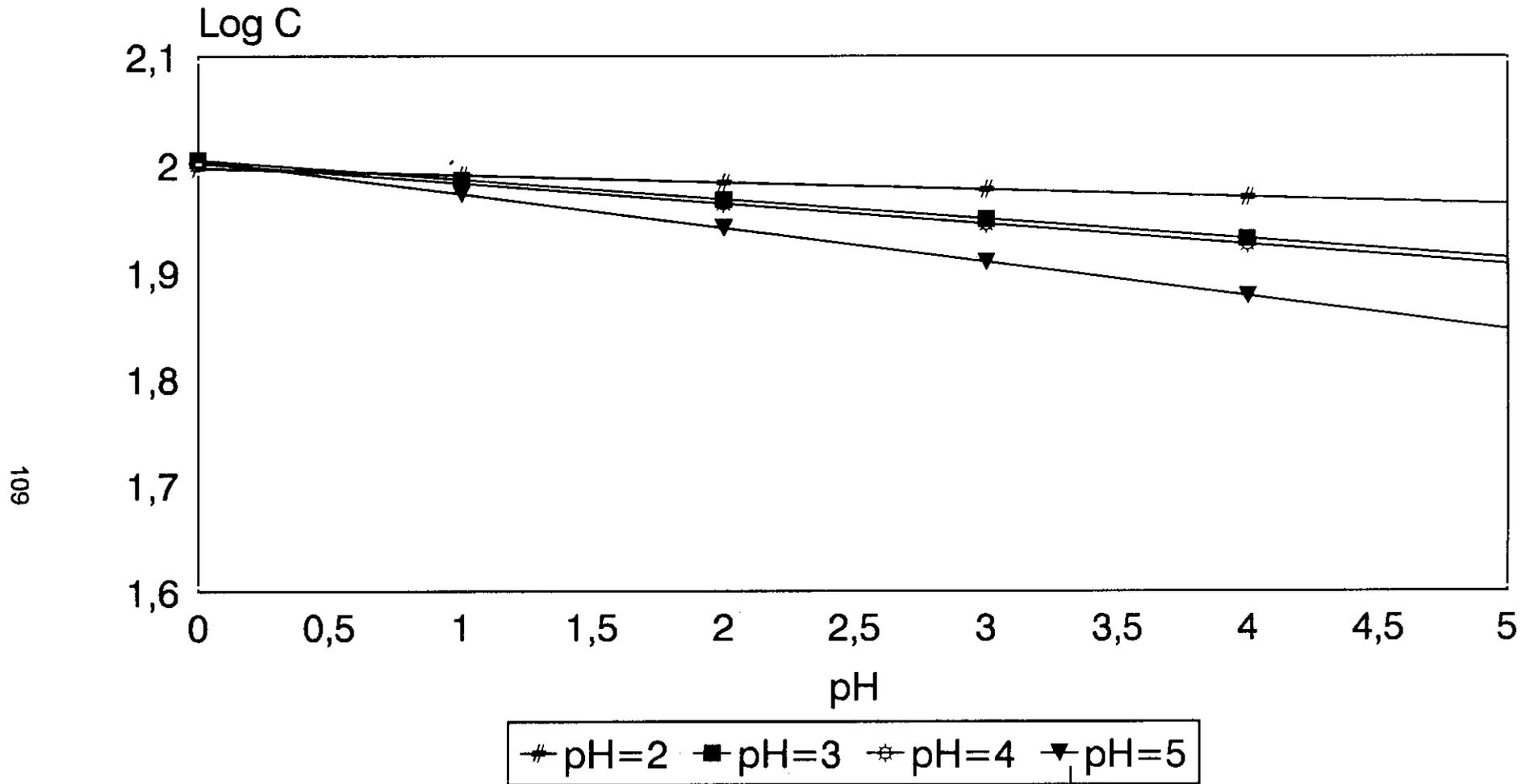


Figura 52.- Representación del Log C frente al tiempo en distintos pH. Relación 1:1.

T=40 °C

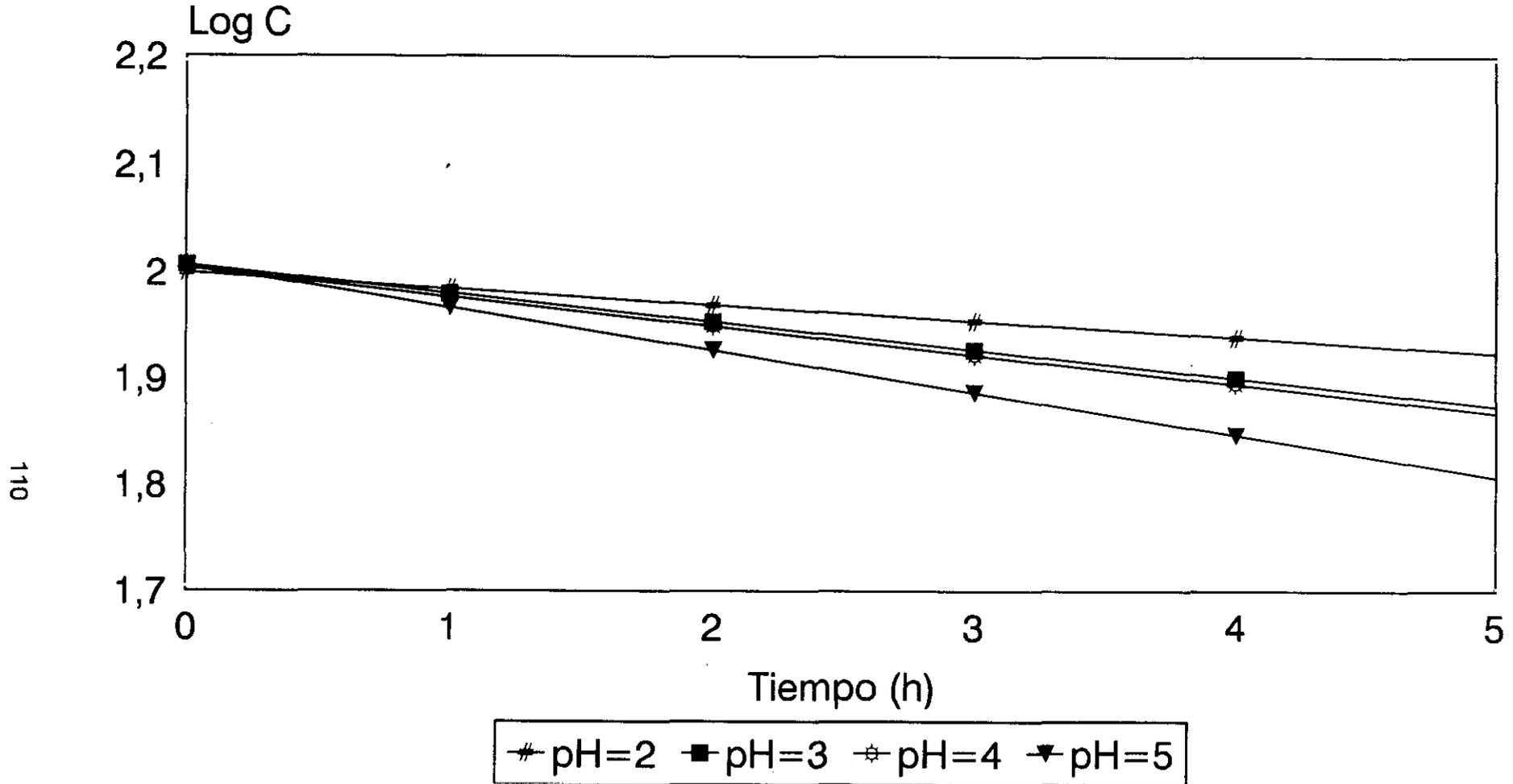


Figura 53.- Representación del Log C frente al tiempo en distintos pH. Relación 1:1.

T=50 °C

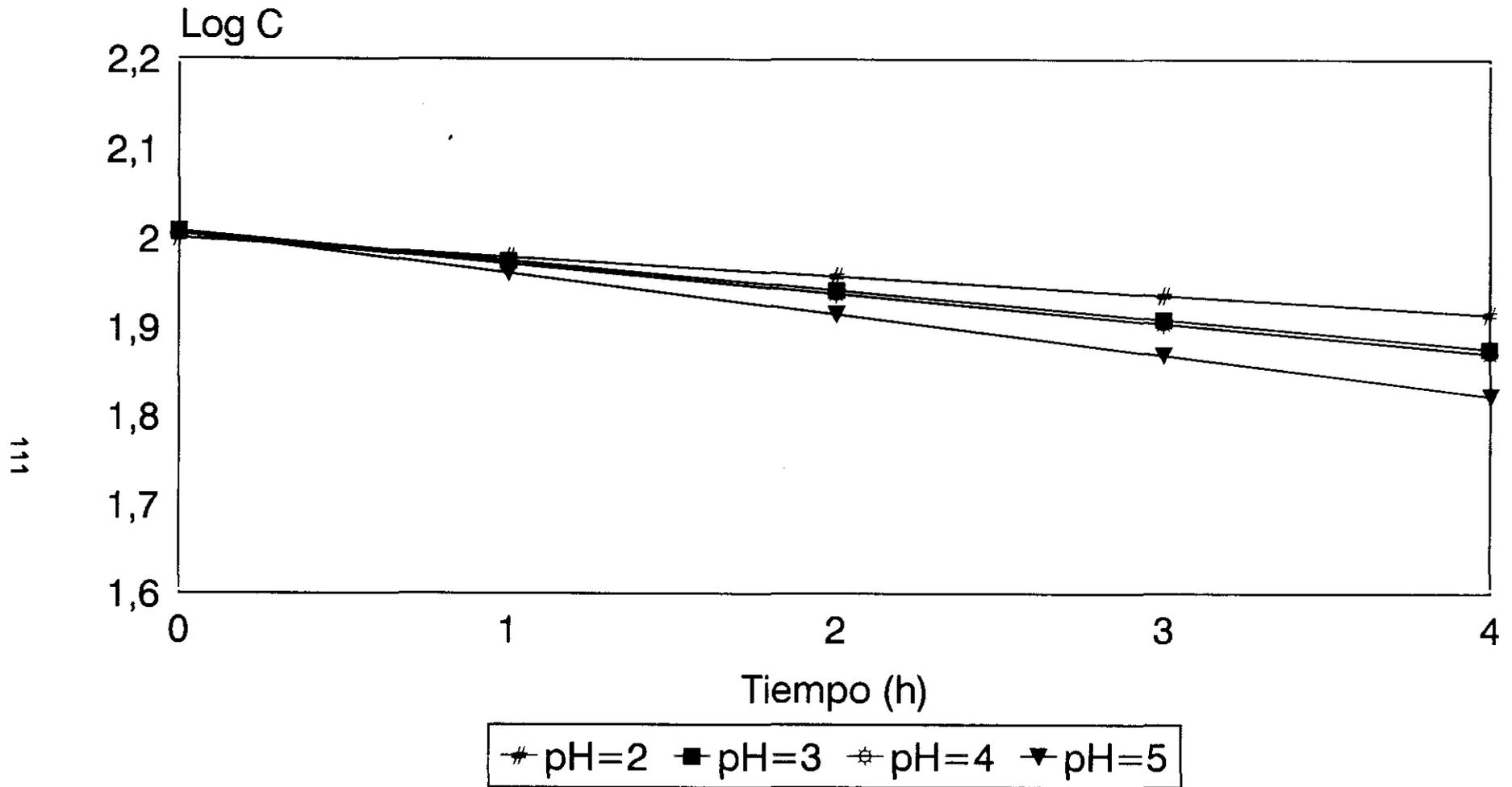


Figura 54.- Representación del Log C frente al tiempo en distintos pH. Relación 1:1.

T=60 °C

112

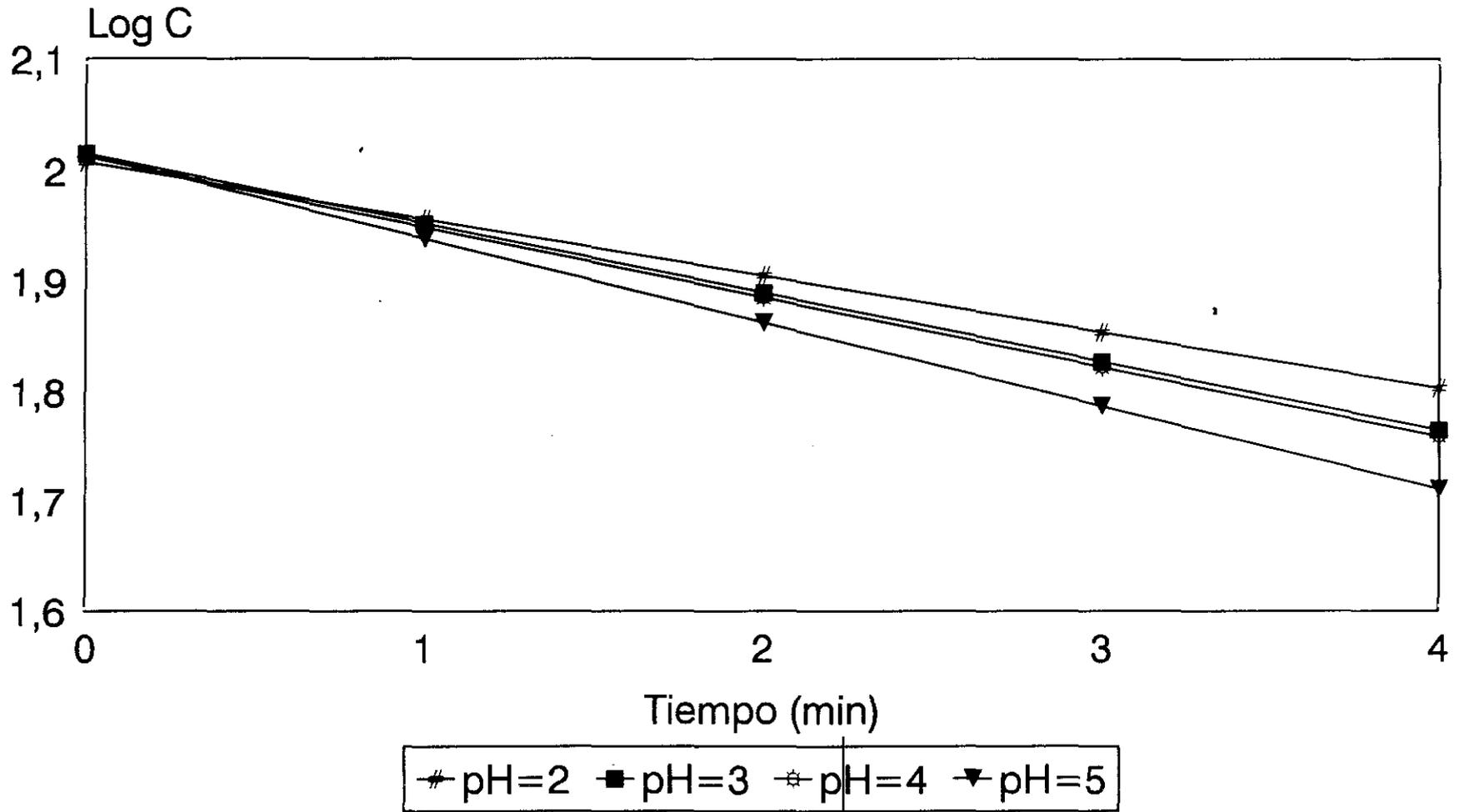


Figura 55.- Representación del Log C frente al tiempo en distintos pH . Relación 1:1.

Tabla XVII.- Constantes observadas de orden uno.
pH: a) 2 .b) 3. c) 4.d) 5.

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	0,01	0,015	0,032	0,051
b	0,036	0,042	0,052	0,063
c	0,039	0,043	0,053	0,064
d	0,067	0,072	0,095	0,115
40 a	0,029	0,035	0,045	0,056
b	0,055	0,061	0,071	0,082
c	0,057	0,062	0,073	0,084
d	0,086	0,092	0,101	0,134

Tabla XVIIb.- Constantes observadas de orden uno.
pH: a) 2 .b) 3. c) 4.d) 5.

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
50 a	0,043	0,049	0,059	0,07
b	0,07	0,076	0,086	0,097
c	0,071	0,077	0,087	0,098
d	0,1	0,106	0,114	0,148
60 a	0,112	0,128	0,139	0,138
b	0,138	0,144	0,155	0,165
c	0,14	0,146	0,156	0,167
d	0,169	0,175	0,175	0,217

Si comparamos las constantes observadas de la reacción de hidrólisis de la Cefitoxima con las correspondientes a las del complejo Cefitoxima-Cu, en una relación 1:1 y a 30°C, se aprecia una situación de menor estabilidad en los valores de pH más ácidos (2-3) en la Cefitoxima con respecto al complejo Cefitoxima-Cu, y una semejante con el aumento del pH (4-5), tal como se observa en la siguiente Tabla:

pH	Cefitoxima	Cefitoxima-Cu
2	0,172	0,015
3	0,091	0,042
4	0,044	0,043
5	0,075	0,072

Por otra parte, si comparamos los resultados obtenidos en el complejo Cefitoxima-Cu, con las del complejo Ampicilina-Cu, estudiado por nosotros en un trabajo anterior(100), tal como se muestra en la siguiente Tabla:

pH	Ceftizoxima-Cu	Ampicilina-Cu
2	0,015	0,007
3	0,042	0,004
4	0,043	0,056
5	0,072	0,126

se observa una mayor estabilidad en el complejo Ceftizoxima-Cu en los valores de pH menos ácidos (4-5) y una menor en los más ácidos (2-3).

La representación del log de las K observadas frente a los valores de pH ensayados, nos da en el complejo Ceftizoxima-Cu como resultado la gráfica de la figura 56, en donde se puede apreciar una tendencia a una mayor degradación conforme el pH adquiere valores menos ácidos o una mayor estabilidad a pH muy ácidos, con valores semejantes de las constantes observadas en los valores de pH 3 y 4, siguiendo un orden de estabilidad:

$$\text{pH } 2 > 3 \approx 4 > 5$$

que es inverso al observado en la degradación de la Ceftizoxima en esos valores de pH:

$$\text{pH } 4 > 5 > 3 > 2$$

si exceptuamos el comportamiento del pH 5 en la Ceftizoxima.

Relación 1:1

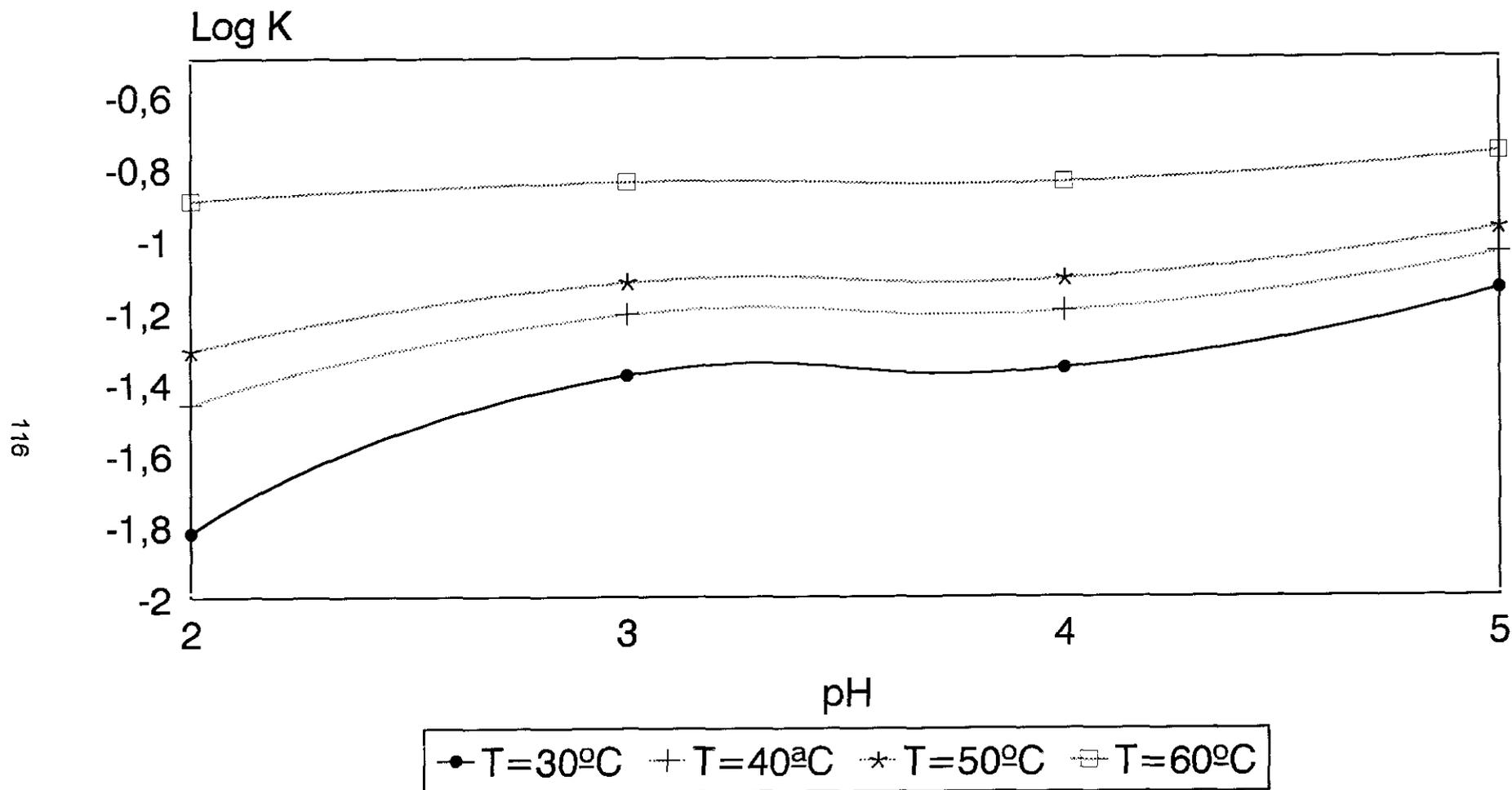


Figura 56.- Representación del log K obs. frente al pH en la relación 1:1.

Influencia de la temperatura

Se ha mantenido para este ensayo, constantes el valor del pH relación molar y fuerza iónica del tampón.

Si representamos gráficamente el log C frente al tiempo, en los distintos valores de temperaturas, manteniendo fijo el pH en 2 y la relación molar en 1:1, obtenemos la representación de la figura 57, donde se manifiesta como en la Ceftizoxima, una menor pendiente en la recta correspondiente a la menor temperatura (30 °C), para ir incrementando según la aumentamos. En los demás valores de pH y relaciones molares la situación es idéntica.

Las correspondientes rectas de regresión lineal obtenidas por la aplicación de la ecuación de Arrhenius, se muestran en la figuras 58 y 59 (en 3D), y las Energías de Activación correspondientes en la Tabla XVIII, en la que se observa que la Energía de Activación de Arrhenius, sigue un orden:

$$\text{pH } 2 > 4 \approx 3 > 5$$

que resulta semejante al orden de estabilidad, como también ha quedado establecido en la Ceftizoxima.

Relación 1:1

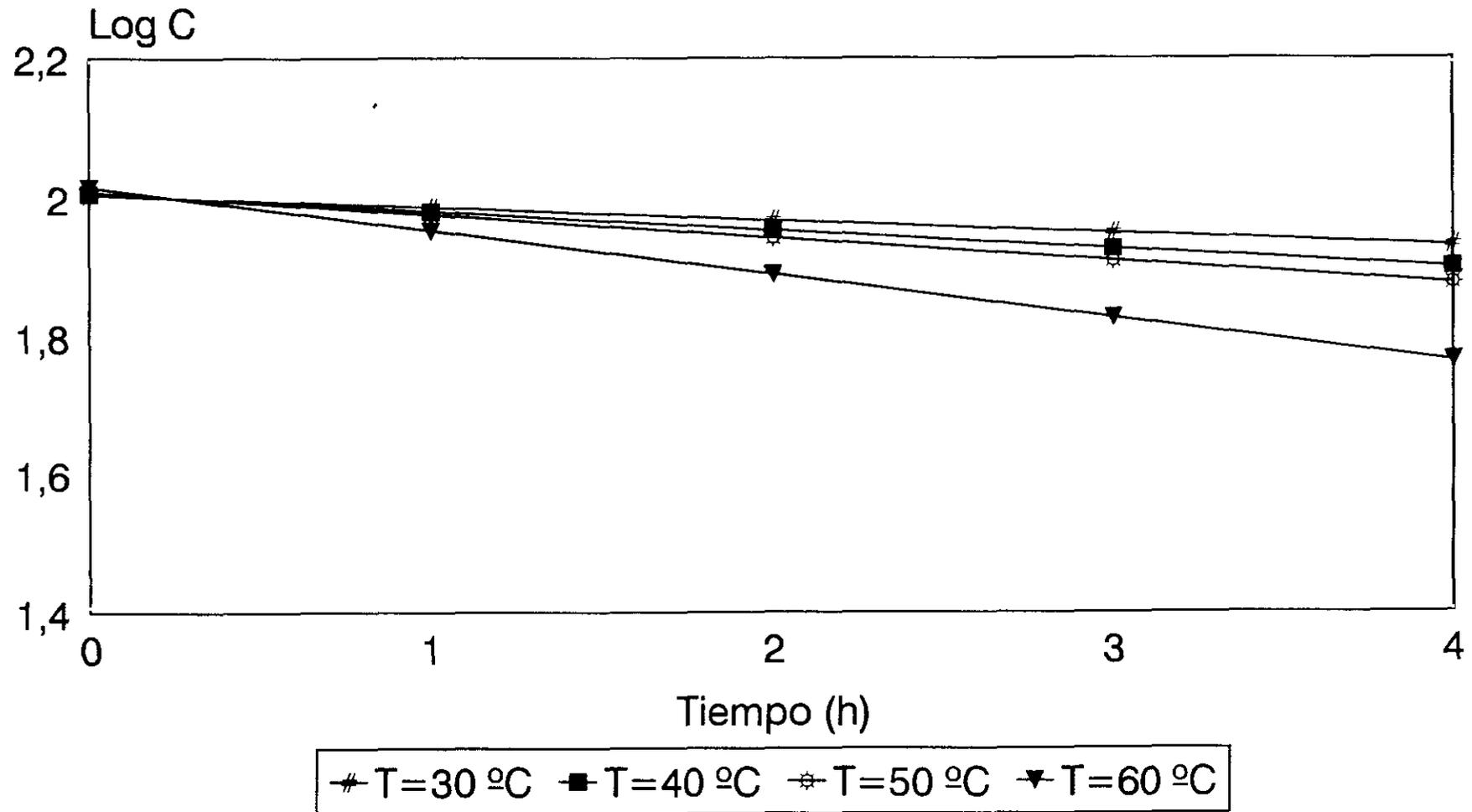


Figura 57.- Representación del Log C frente al tiempo a distintas temperaturas. pH=2

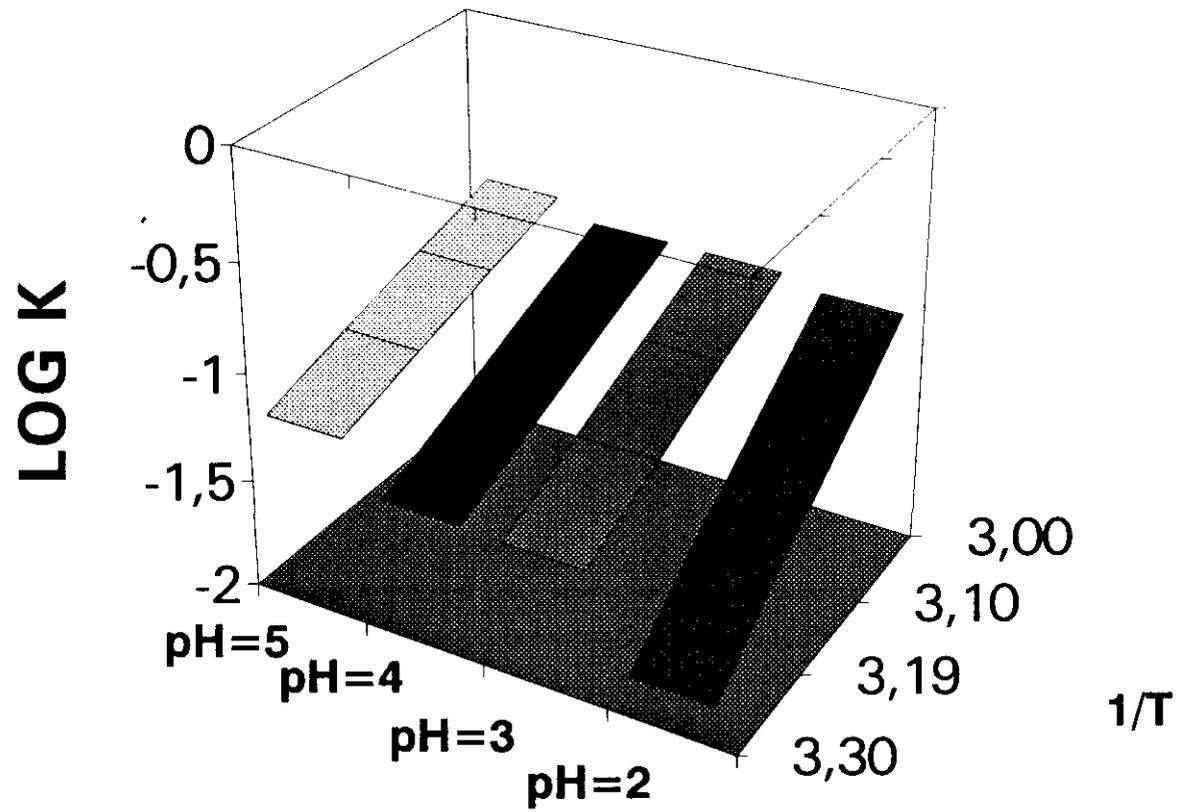


Figura 58.- Representación de Arrhenius. en 3D en la relación 1:1.

Relación 1:1

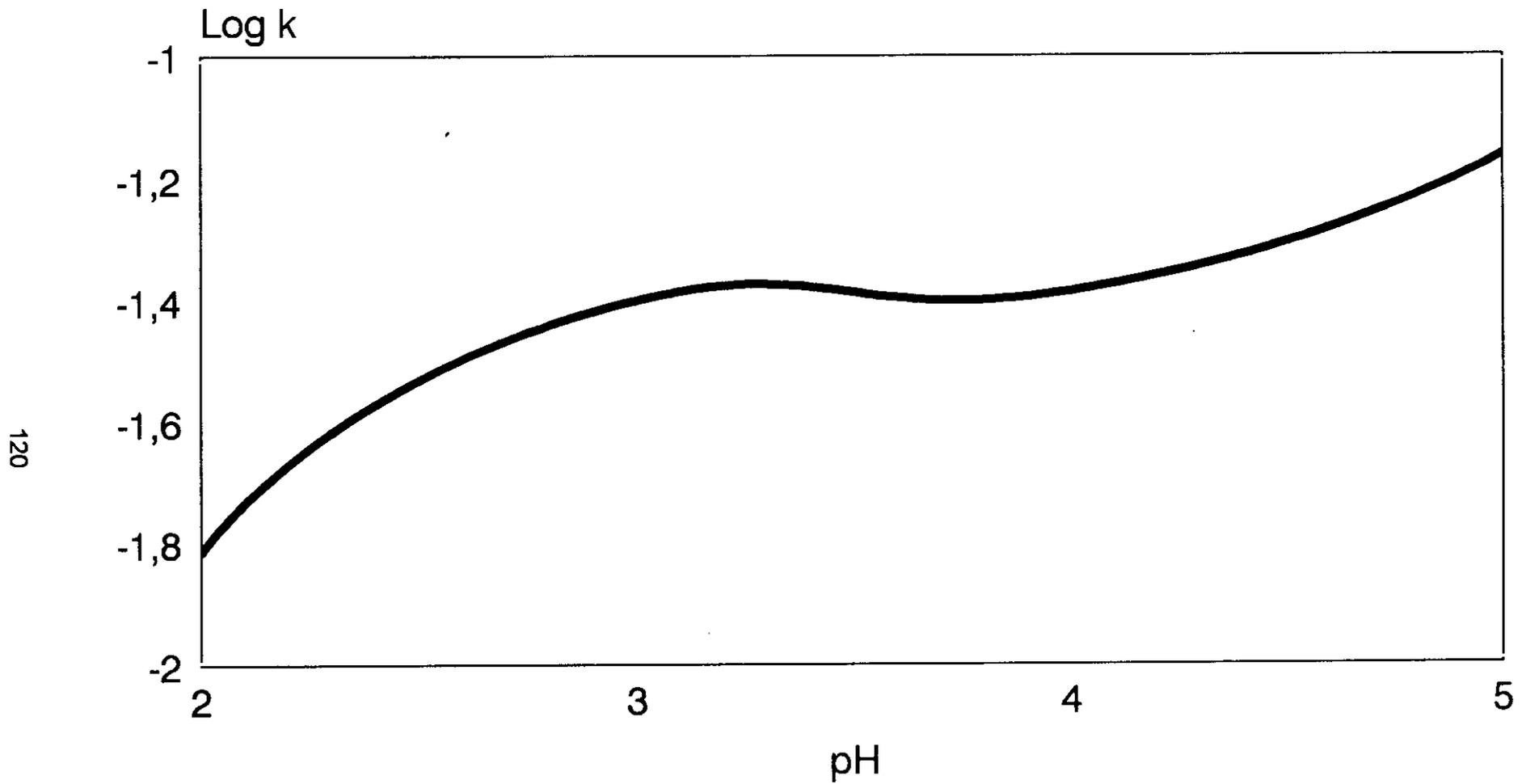


Figura 59.- Representación del log k frente al pH.

Tabla XVIII.- Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (kcal/mol).

pH	0,5:1	1:1	2:1	3:1
2	15,42	13,46	9,26	6,45
3	8,56	7,85	6,89	6,11
4	8,05	7,7	6,77	6,02
5	5,89	5,56	3,9	4,02

Influencia de la concentración de Cobre

En estos ensayos, hemos mantenido constantes los valores de pH, fuerza iónica del tampón y temperatura.

Si representamos gráficamente los valores de los logaritmos de las K observadas, frente a las relaciones molares ensayadas (0,5:1, 1:1, 2:1 y 3:1), se obtienen las rectas que se muestran en las figuras 60 a 63, en los distintos valores de pH (2-5) y a las distintas temperaturas. En todas ellas, se observa que el $\log K_{\text{observ.}}$, va aumentando con la relación molar, lo que implica una menor estabilidad conforme se incrementa la concentración de Cu(II), por lo que el Cu(II) que no ha formado complejo, debe también catalizar en cierta manera la reacción de hidrólisis.

T=30 °C

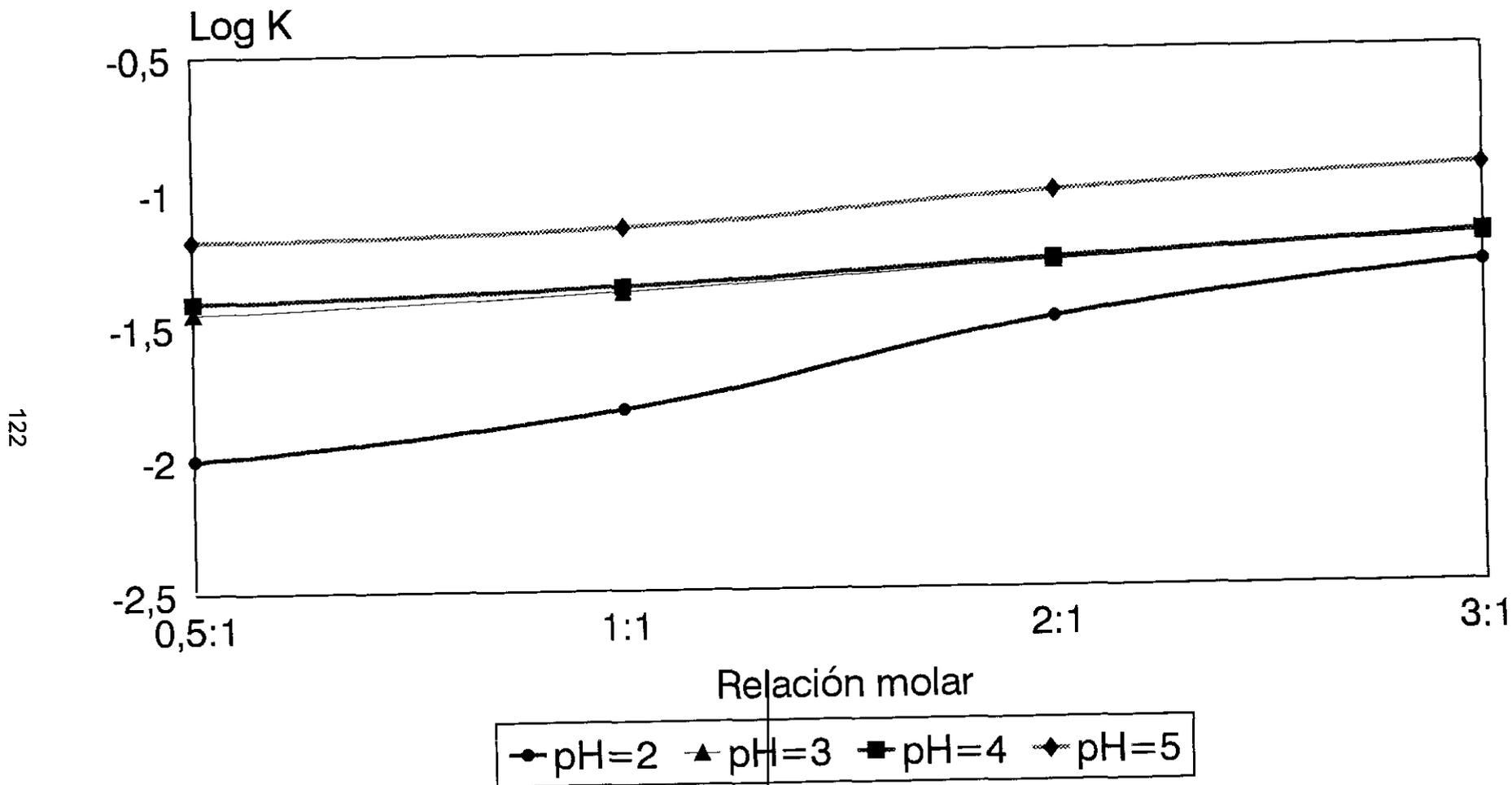


Figura 60.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

T=40 °C

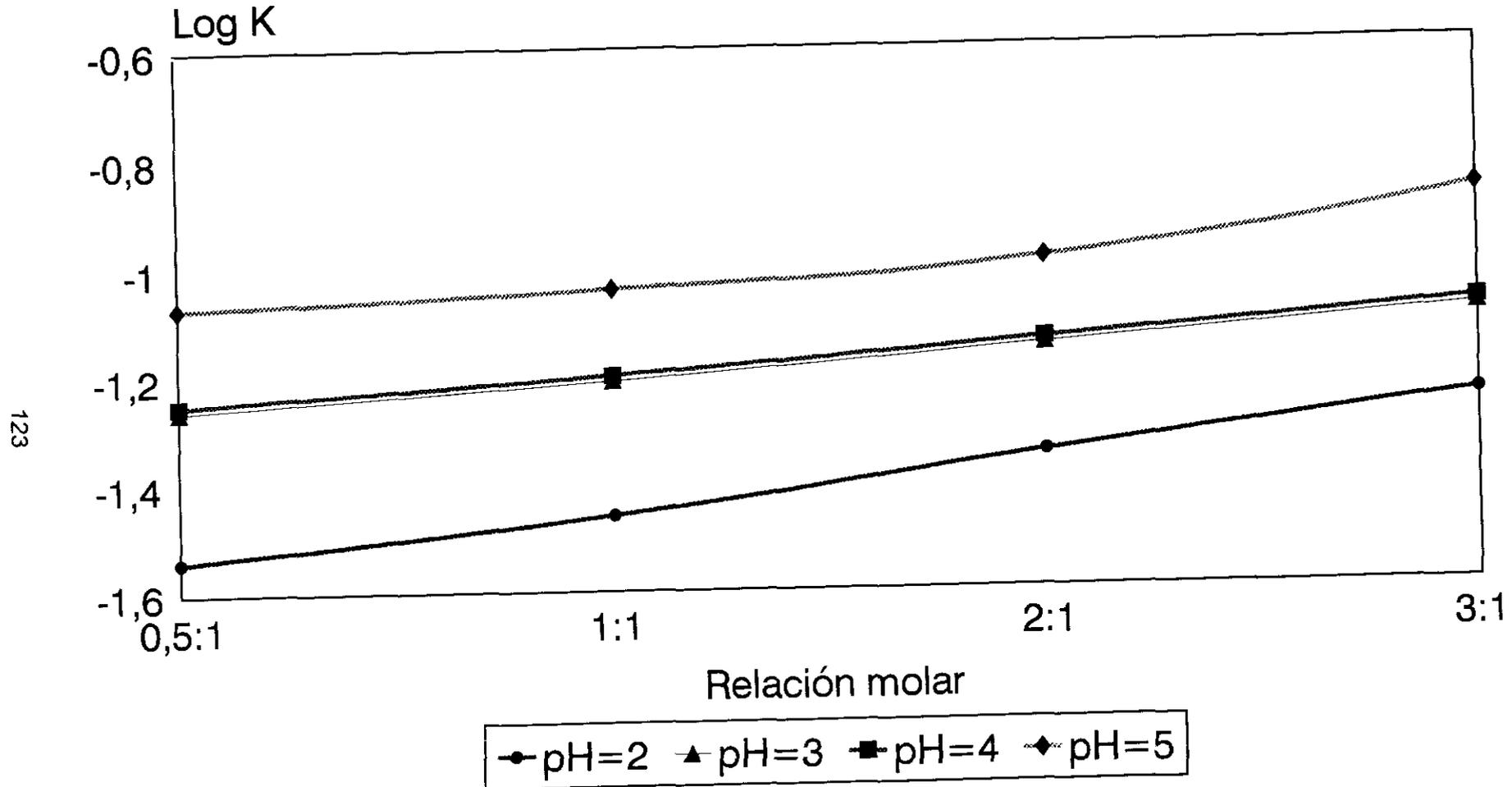


Figura 61.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

T=50 °C

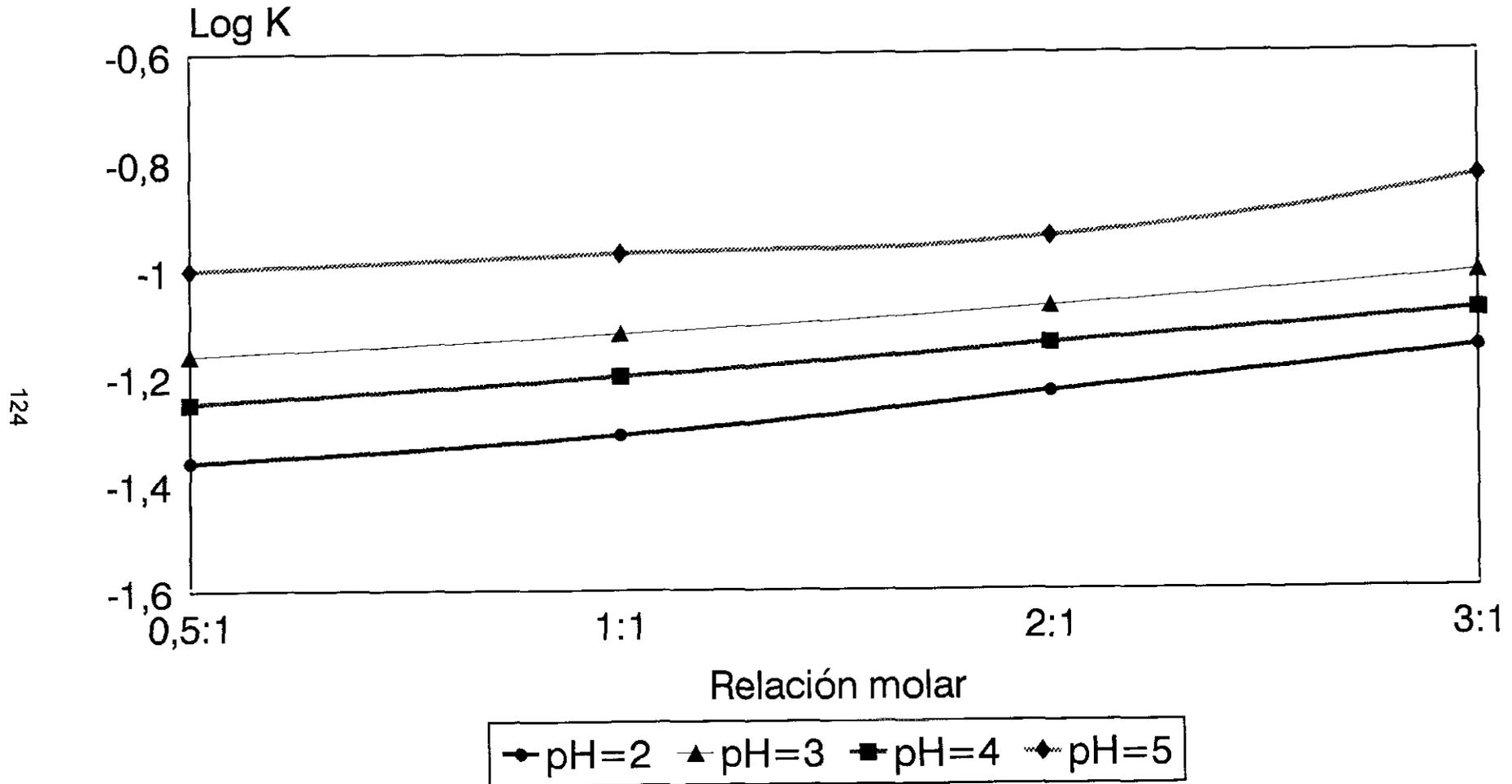
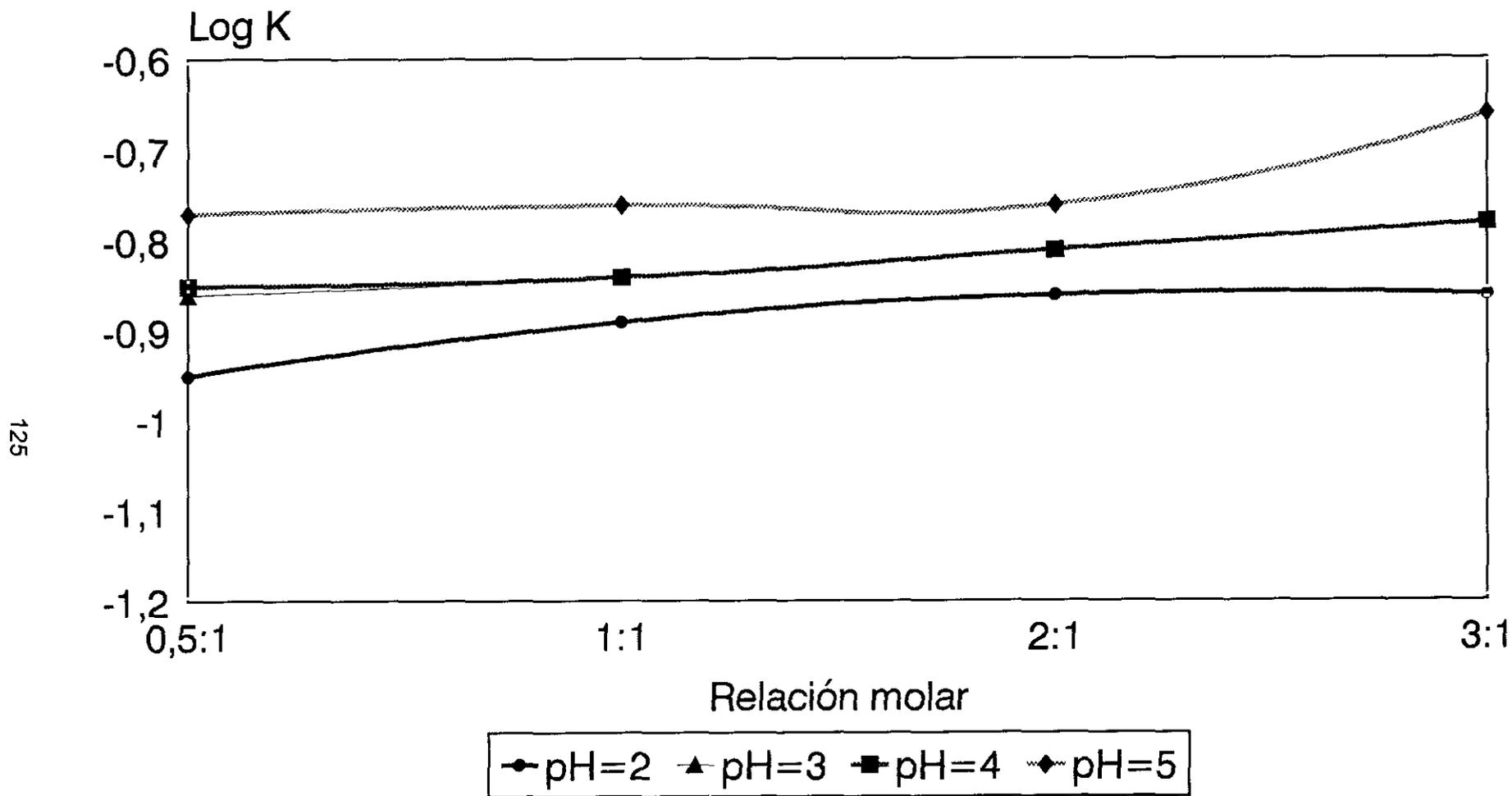


Figura 62.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

T=60 °C

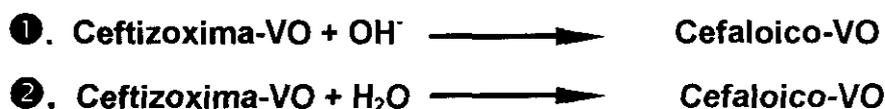


125

Figura 63.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

Ceftizoxima-VO

Como en el complejo Ceftizoxima-Cu, el mecanismo de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-VO, implica la ruptura del anillo β -lactama, con dos reacciones, según el esquema:



predominando en nuestro caso la catálisis acuosa, al operar a pH ácidos.

Las constantes cinéticas, en este caso, se han determinado a partir de las áreas cromatográficas del pico de tiempo de retención 7,1 min., que se corresponde con el isómero mayoritario del complejo Ceftizoxima-VO, en los valores de pH, temperaturas y relaciones molares establecidas en nuestro ensayo. En las Tablas XIX a XXII, se muestran los valores de las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas con los valores de concentración, en %, con respecto al tiempo de hidrólisis, en los valores de pH 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

Orden de la reacción

Como en la reacción de hidrólisis del complejo Ceftizoxima-Cu, el orden en ésta, debe corresponderse con un pseudo orden uno, ya que los coeficientes de regresión lineal son semejantes tanto en orden cero, como para los ordenes uno y dos, tal como se muestra en las Tablas XXIII a XXVI, en los valores de pH 2, 3, 4 y 5 respectivamente, por lo que las constantes cinéticas que hemos determinado en este caso, también son las de orden uno.

Tabla X IX.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=2

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-1,3	-1,85	-2,75	-3,66
b	99,62	98,47	96,55	94,62
40	-3,06	-3,55	-4,37	-5,19
	100,06	98,9	96,95	95,01
50	-4,3	-4,76	-5,52	-6,28
	100,3	99,12	97,17	95,21
60	-9,25	-9,56	-10,08	-10,61
	100,64	99,45	97,48	95,51

Tabla XX.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=3

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-3,54	-4,02	-4,82	-5,62
b	101,61	100,4	98,38	96,36
40	-5,16	-5,59	-6,31	-7,03
	101,94	100,72	98,68	96,65
50	-6,3	-6,7	-7,36	-8,03
	102,1	100,87	98,83	96,78
60	-10,84	-11,11	-11,55	-12
	102,1	100,88	98,83	96,79

Tabla XXI.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=4

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-3,8	-4,27	-5,06	-5,85
b	100,5	99,32	97,35	95,39
40	-5,38	-5,81	-6,52	-7,23
	100,81	99,62	97,64	95,66
50	-6,5	-6,89	-7,55	-8,2
	100,96	99,77	97,78	95,79
60	-10,94	-11,2	-11,64	-12,08
	100,95	99,76	97,77	95,78

Tabla XXII.- Pendientes(a) y ordenadas(b) en el origen, de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH=5

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-6,07	-6,47	-8,4	-9,2
b	101,27	100,06	100	95,57
40	-7,51	-7,87	-8,36	-10,36
	101,51	100,3	98,69	95,73
50	-8,53	-8,86	-9,31	-11,17
	101,6	100,39	98,78	95,77
60	-12,56	-12,78	-13,07	-14,39
	101,39	100,18	98,57	95,45

Tabla XXIII.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=2

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,94	-0,904	-0,84	-0,803
b	-0,941	-0,908	-0,848	-0,811
c	0,941	0,911	0,854	0,819
40	-0,987	-0,979	-0,94	-0,899
	-0,985	-0,981	-0,949	-0,913
	0,982	0,983	0,957	0,927
50	-0,99	-0,989	-0,964	-0,932
	-0,987	-0,989	-0,972	-0,947
	0,982	0,988	0,979	0,96
60	-0,993	-0,994	-0,988	-0,975
	-0,983	-0,988	-0,989	-0,985
	0,968	0,974	0,981	0,983

Tabla XXIV.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=3

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,942	-0,972	-0,97	-0,941
b	-0,94	-0,971	-0,974	-0,952
c	0,939	0,969	0,976	0,961
40	-0,969	-0,986	-0,986	-0,967
	-0,965	-0,983	-0,989	-0,977
	0,962	0,98	0,989	0,984
50	-0,976	-0,989	-0,99	-0,975
	-0,971	-0,985	-0,991	-0,984
	0,966	0,98	0,99	0,989
60	-0,992	-0,997	-0,996	-0,989
	-0,981	-0,988	-0,994	-0,994
	0,965	0,972	0,981	0,986

Tabla XXV.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=4

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,925	-0,941	-0,934	-0,91
b	-0,925	-0,943	-0,94	-0,922
c	0,925	0,943	0,945	0,932
40	-0,962	-0,971	-0,964	-0,944
	-0,959	-0,97	-0,969	-0,957
	0,956	0,968	0,972	0,966
50	-0,971	-0,977	-0,973	-0,957
	-0,967	-0,976	-0,977	-0,969
	0,962	0,972	0,978	0,976
60	-0,99	-0,992	-0,989	-0,98
	-0,98	-0,985	-0,989	-0,988
	0,963	0,97	0,977	0,981

Tabla XXVI.- Coeficientes de Regresión lineal. Orden: a) 0 .b)1. c)2.
pH=5

T °C	0,5:1	1:1	2:1	3:1
30 a	-0,987	-0,994	-0,999	-0,97
b	-0,987	-0,995	-0,999	-0,984
c	0,986	0,994	0,995	0,994
40	-0,991	-0,996	-0,994	-0,978
	-0,99	-0,996	-0,998	-0,991
	0,987	0,995	0,999	0,998
50	-0,993	-0,997	-0,996	-0,981
	-0,991	-0,997	-0,999	-0,994
	0,986	0,993	0,998	0,999
60	-0,998	-1	-0,998	-0,987
	-0,991	-0,995	-0,998	-0,999
	0,976	0,981	0,986	0,99

Influencia del pH

La representación gráfica de las rectas de regresión lineal obtenidas con los valores del log C frente al tiempo, en los distintos valores de pH ensayados (2-5), se muestran en las figuras 64 a 67, manteniendo fija la relación molar en 1:1. En ellas se observa una menor pendiente para el pH 5, mientras que los mayores valores de esta, se corresponden con los del pH 2, lo que indica una mayor degradación a pH 5 y una menor a pH más ácidos, tal como sucede en el complejo Ceftizoxima-Cu.

Los valores calculados de las constantes observadas, se muestran en la Tabla XXVII y en la XXVIIb, donde se representan estas constantes en los valores de pH 2 a 5 y a las temperaturas ensayadas.

Si comparamos las constantes observadas de la reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima y las obtenidas en el complejo Ceftizoxima-Cu, con las correspondientes a las del complejo Ceftizoxima-VO, en una relación 1:1 y a 30°C, se aprecia también, una situación de menor estabilidad en los valores de pH más ácidos (2-3) en la Ceftizoxima con respecto al complejo Ceftizoxima-VO, y una semejante con el aumento del pH (4-5), tal como sucede en el complejo Ceftizoxima-Cu, mientras que el complejo Ceftizoxima-VO manifiesta valores ligeramente superiores de las constantes observadas con respecto al complejo Ceftizoxima-Cu, con lo que la velocidad de la reacción debe ser semejante en ambos complejos, tal como se muestra en la siguiente Tabla:

pH	Ceftizoxima	Ceftizoxima-VO	Ceftizoxima-Cu
2	0,172	0,019	0,015
3	0,091	0,044	0,042
4	0,044	0,047	0,043
5	0,075	0,074	0,072

La representación del log de las K observadas frente a los valores de pH ensayados, nos da en el complejo Ceftizoxima-VO como resultado la gráfica de la figura 68, donde se pone de manifiesto, como ocurre en el complejo Ceftizoxima-Cu, una tendencia a una mayor estabilidad a pH muy ácidos, con valores semejantes de las constantes observadas en los valores de pH 3 y 4, siguiendo un orden de estabilidad:

$$\text{pH } 2 > 3 \approx 4 > 5$$

que resulta así mismo inverso al observado en la degradación de la Ceftizoxima en esos valores de pH, exceptuando el valor del pH 5 en la Ceftizoxima.

T=30 °C

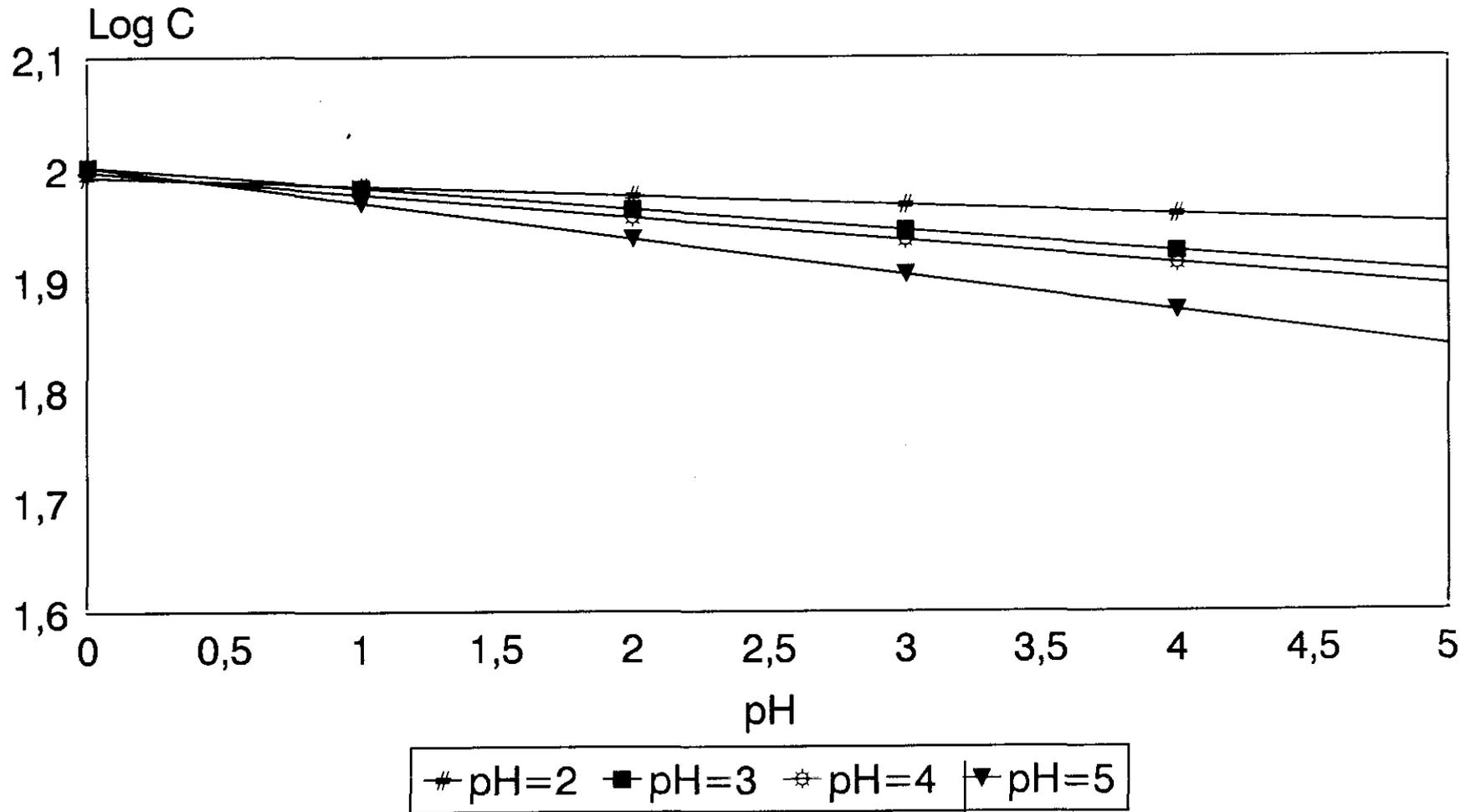


Figura 64.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH. Relación 1.1.

T=40 °C

134

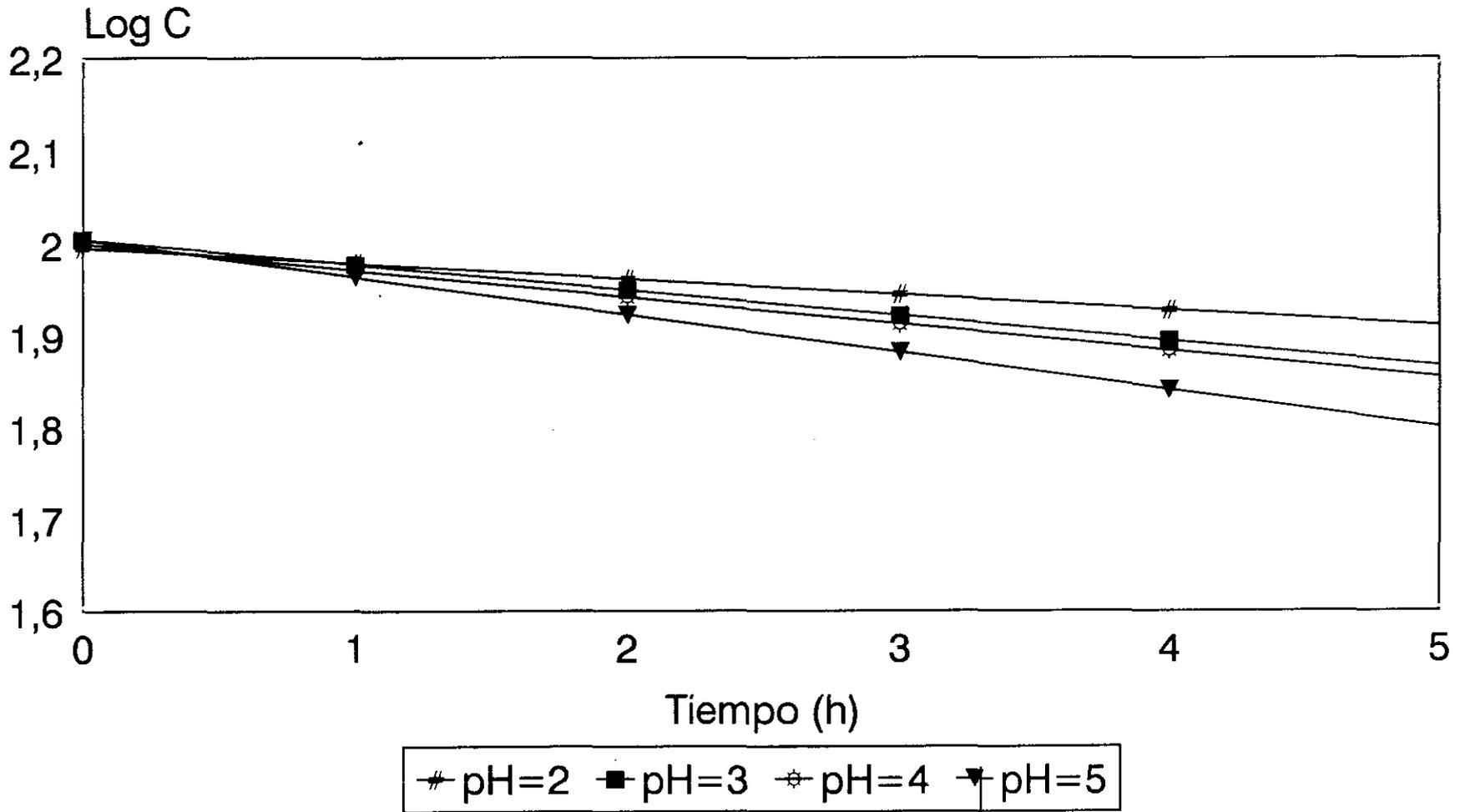


Figura 65.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH.

T=50 °C

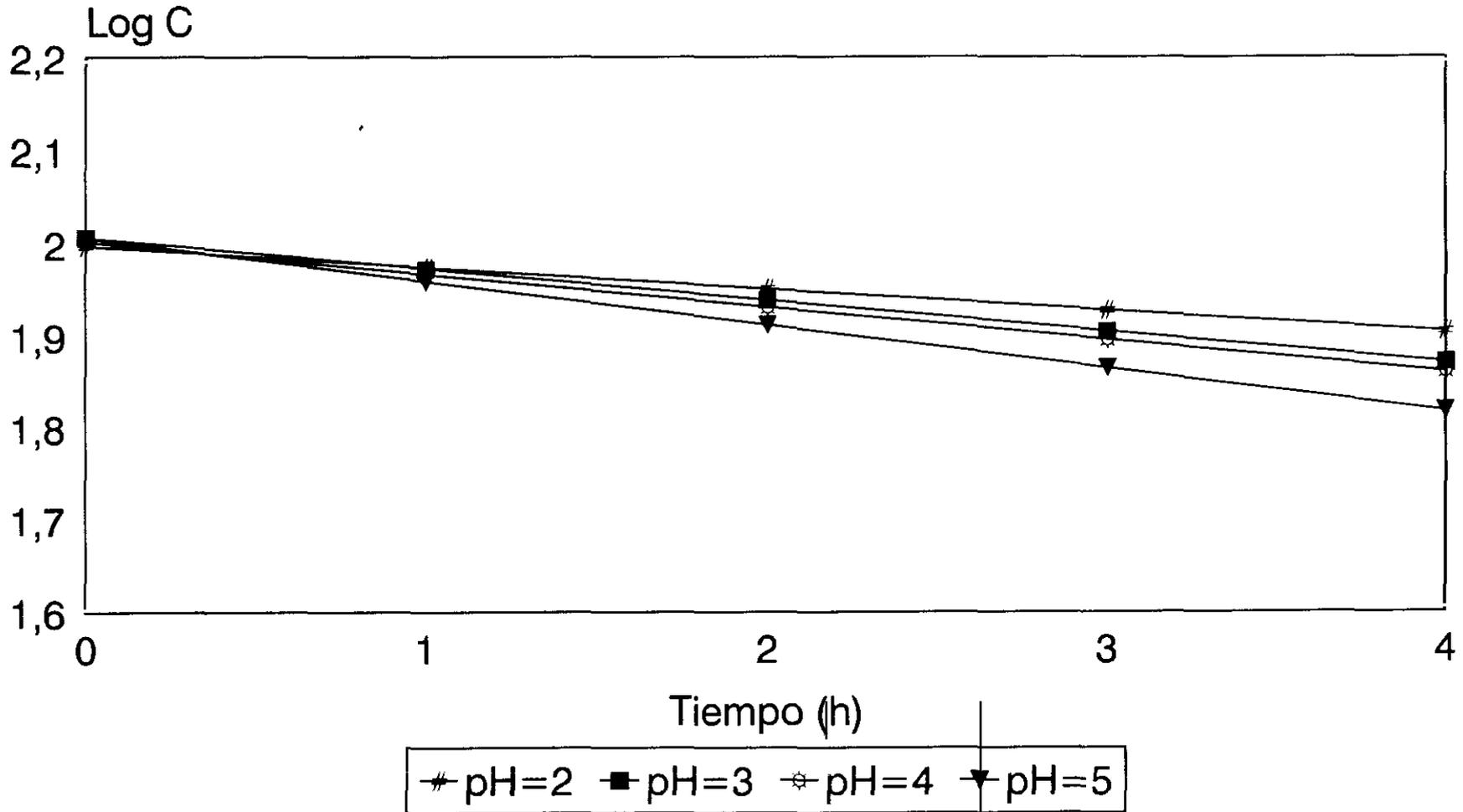


Figura 66.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH.

T=60 °C

136

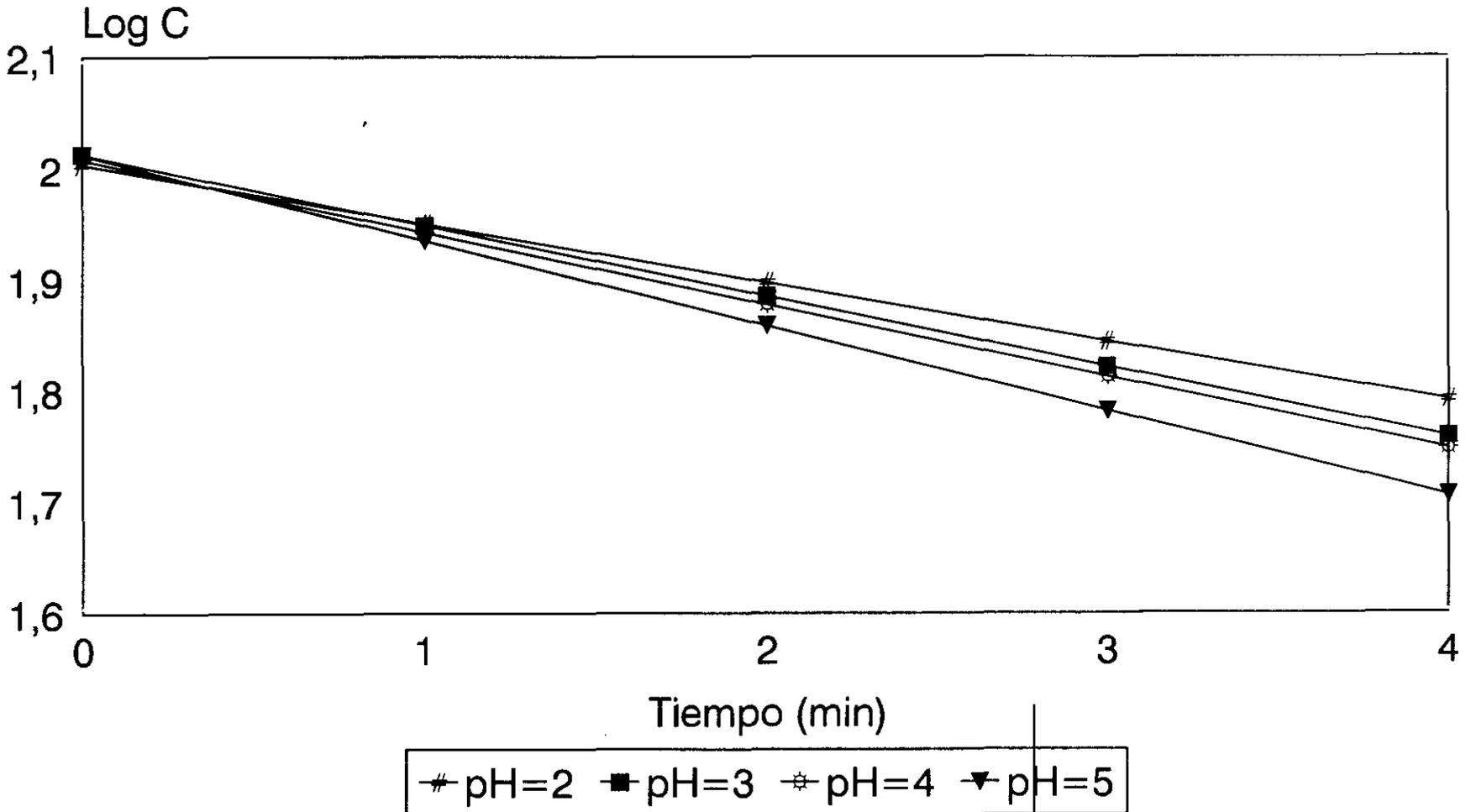


Figura 67.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH .

Tabla XXVII.- Constantes observadas de orden uno.
Relaciones: a) 0,5:1 .b) 1:1. c) 2:1.d) 3:1.

T °C	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5
30 a	0,013	0,038	0,041	0,069
b	0,019	0,044	0,047	0,074
c	0,03	0,054	0,058	0,102
d	0,04	0,065	0,068	0,117
40 a	0,033	0,057	0,061	0,088
b	0,039	0,063	0,067	0,094
c	0,049	0,073	0,077	0,102
d	0,06	0,084	0,088	0,136

Tabla XXVIIb.- Constantes observadas de orden uno.
Relación: a) 0,5:1 .b) 1:1. c) 2:1.d) 3:1.

T °C	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5
50 a	0,047	0,072	0,075	6,77
b	0,053	0,078	0,081	6,4
c	0,063	0,088	0,091	5,95
d	0,074	0,099	0,102	4,59
60 a	0,116	0,14	0,144	4,05
b	0,132	0,146	0,15	3,92
c	0,143	0,157	0,16	3,74
d	0,14	0,167	0,171	3,16

Relación 1:1

138

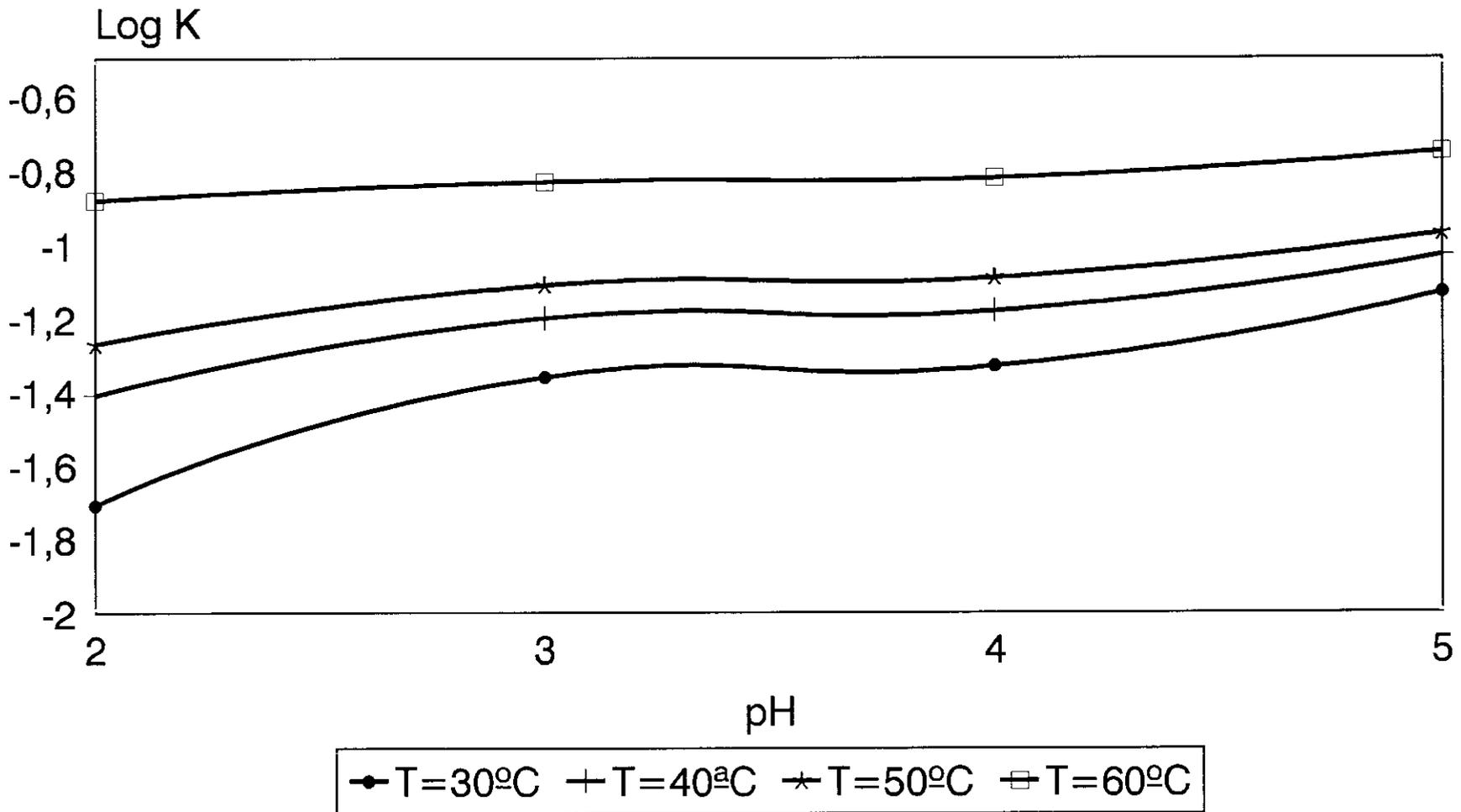


Figura 68.- Representación del log K obs. frente al pH.

Influencia de la temperatura

En la representación gráfica del log C frente al tiempo, en los distintos valores de temperaturas, manteniendo fijo el pH en 2 y la relación molar en 1:1, obtenemos las rectas de regresión de la figura 69, donde de nuevo se observa una menor pendiente en la recta correspondiente a la menor temperatura (30 °C), para ir incrementando según la aumentamos. En los demás valores de pH y relaciones molares la situación es así mismo idéntica.

Las correspondientes rectas de regresión lineal obtenidas por la aplicación de la ecuación de Arrhenius, se muestran en la figuras 70 y 71 (en 3D), y las Energías de Activación en la Tabla XXVIII, en la que se observa un orden idéntico al del complejo Ceftrizoxima-Cu:

$$\text{pH } 2 > 4 \approx 3 > 5$$

que resulta también semejante al orden de estabilidad.

Influencia de la concentración de Vanadilo

En la representación de los valores de los logaritmos de las K observadas, frente a las relaciones molares ensayadas (0,5:1, 1:1, 2:1 y 3:1), obtenemos en este caso, las rectas de regresión que se muestran en las figuras 72 a 75, en los distintos valores de pH (2-5) y a las distintas temperaturas. En todas ellas, y como sucede en el complejo Ceftrizoxima-Cu, se observa que el log K observ., va aumentando con la relación molar, lo que implica así mismo, una menor estabilidad conforme se incrementa la concentración de VO²⁺, por lo que también el VO²⁺ que

Relación 1:1

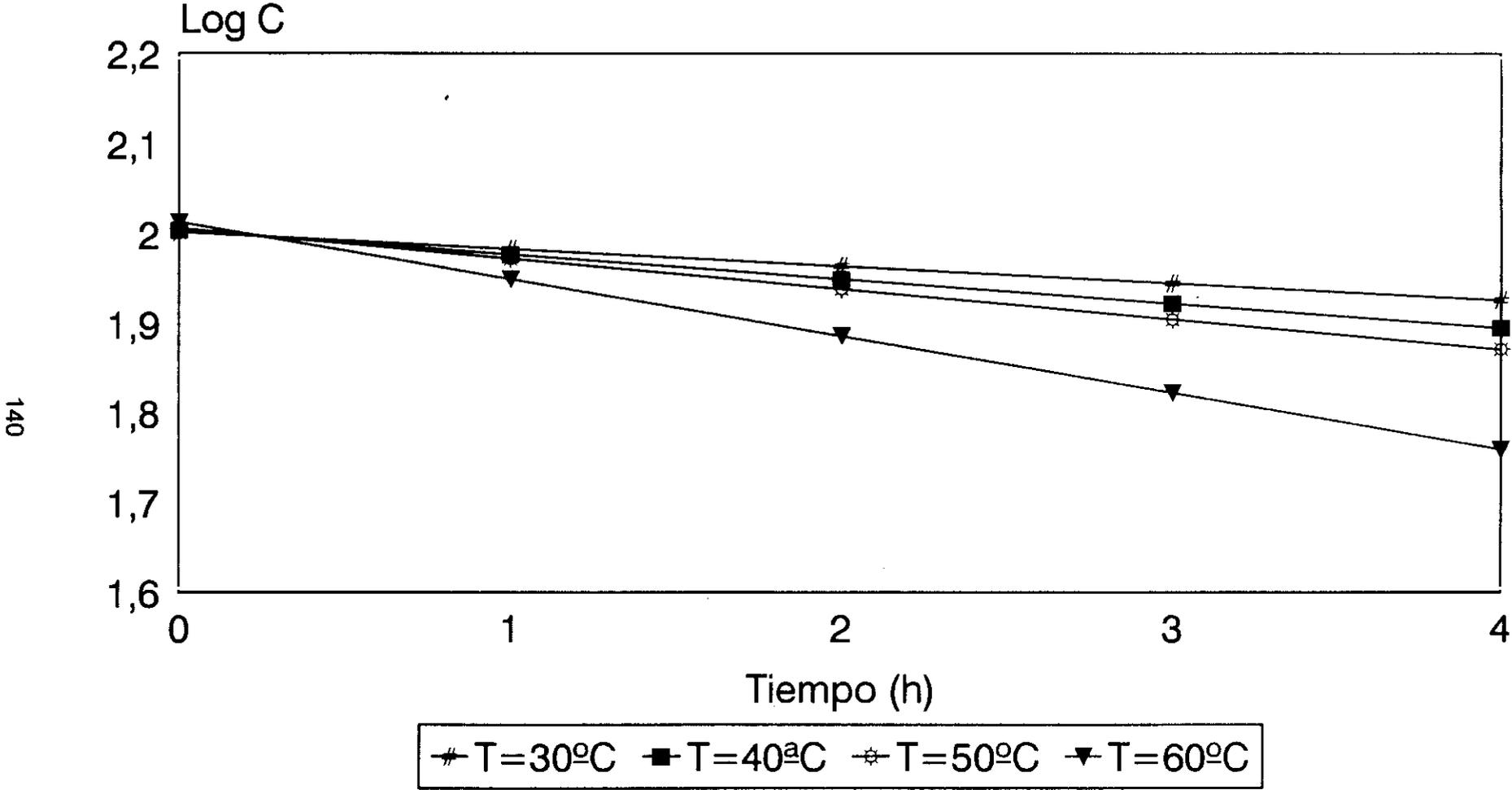


Figura 69.- Representación del Log C frente al tiempo a distintas temperaturas . pH=2.

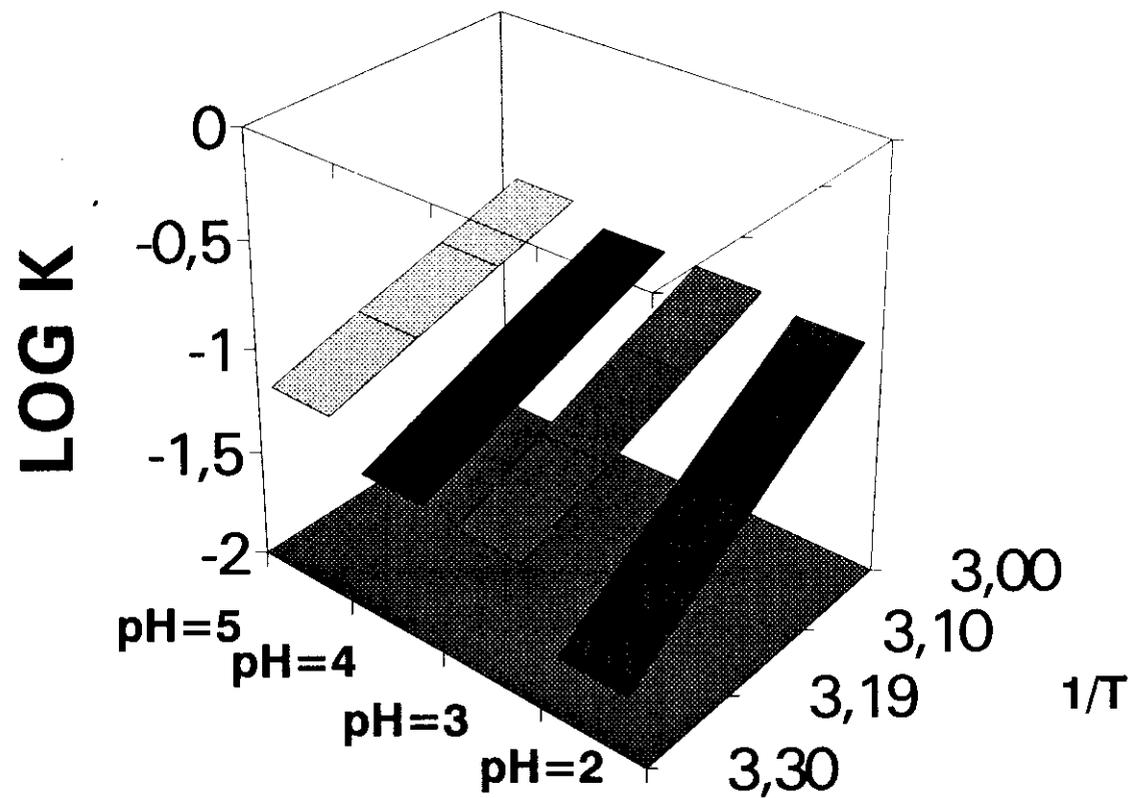


Figura 70.- Representación de Arrhenius. en 3D en la relación 1:1.

Relación 1:1

142

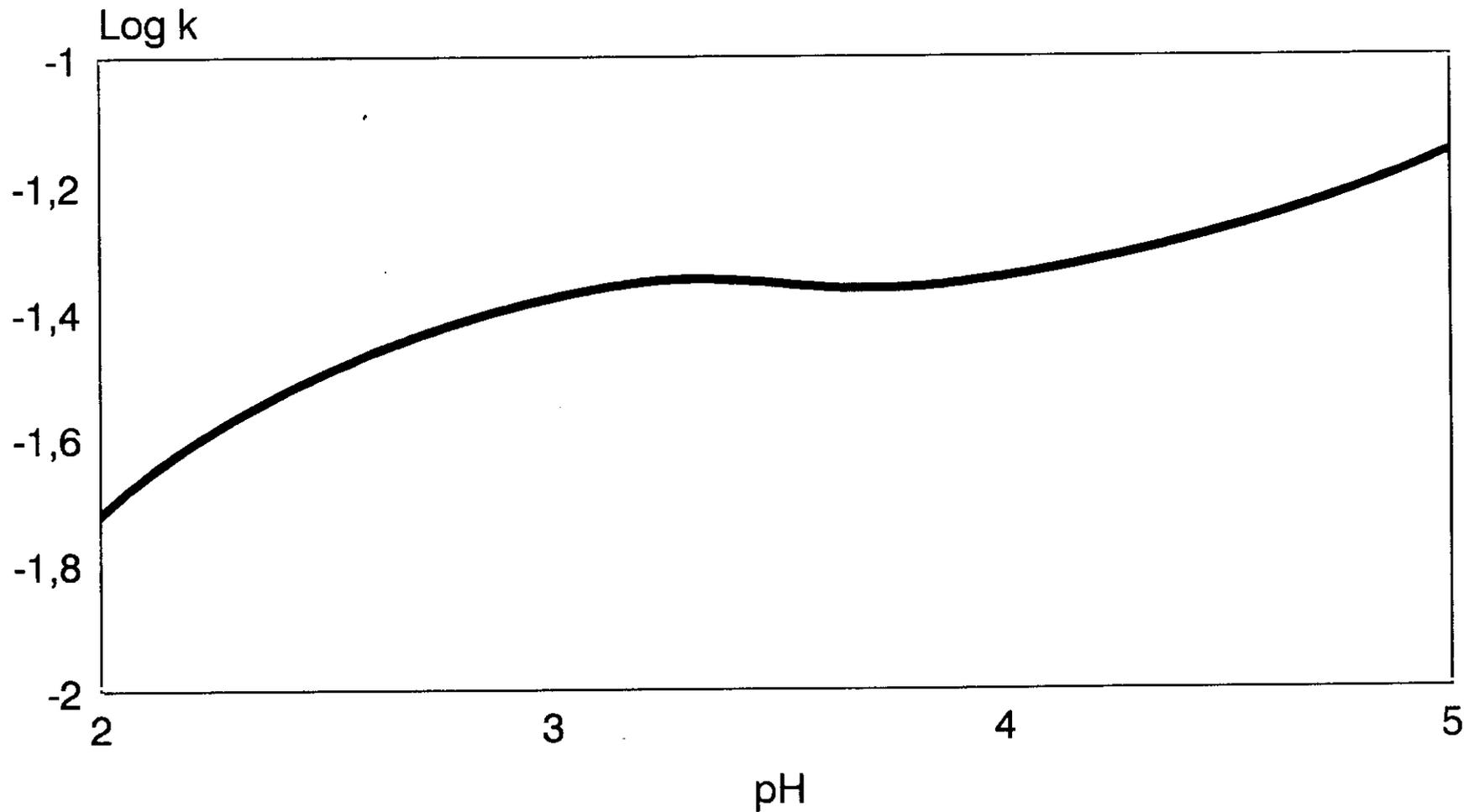
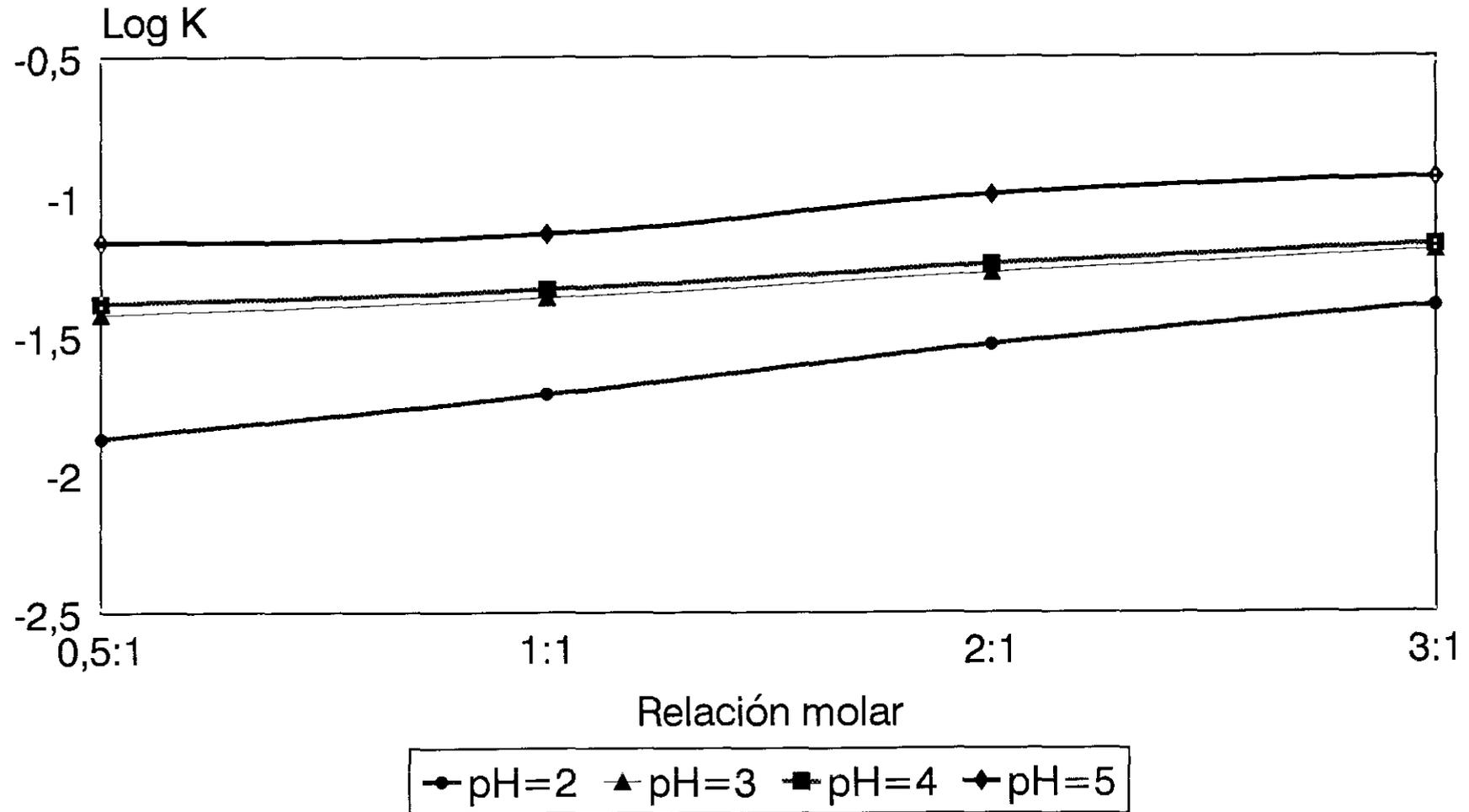


Figura 71.- Representación del log k de Arrhenius frente al pH.

Tabla XXVIII.- Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (kcal/mol).

pH	0,5:1	1:1	2:1	3:1
2	13,7	12,17	9,95	7,89
3	8,3	7,64	6,73	5,99
4	7,9	7,3	6,47	5,79
5	5,77	5,46	3,8	3,96

T=30 °C



144

Figura 72.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

T=40 °C

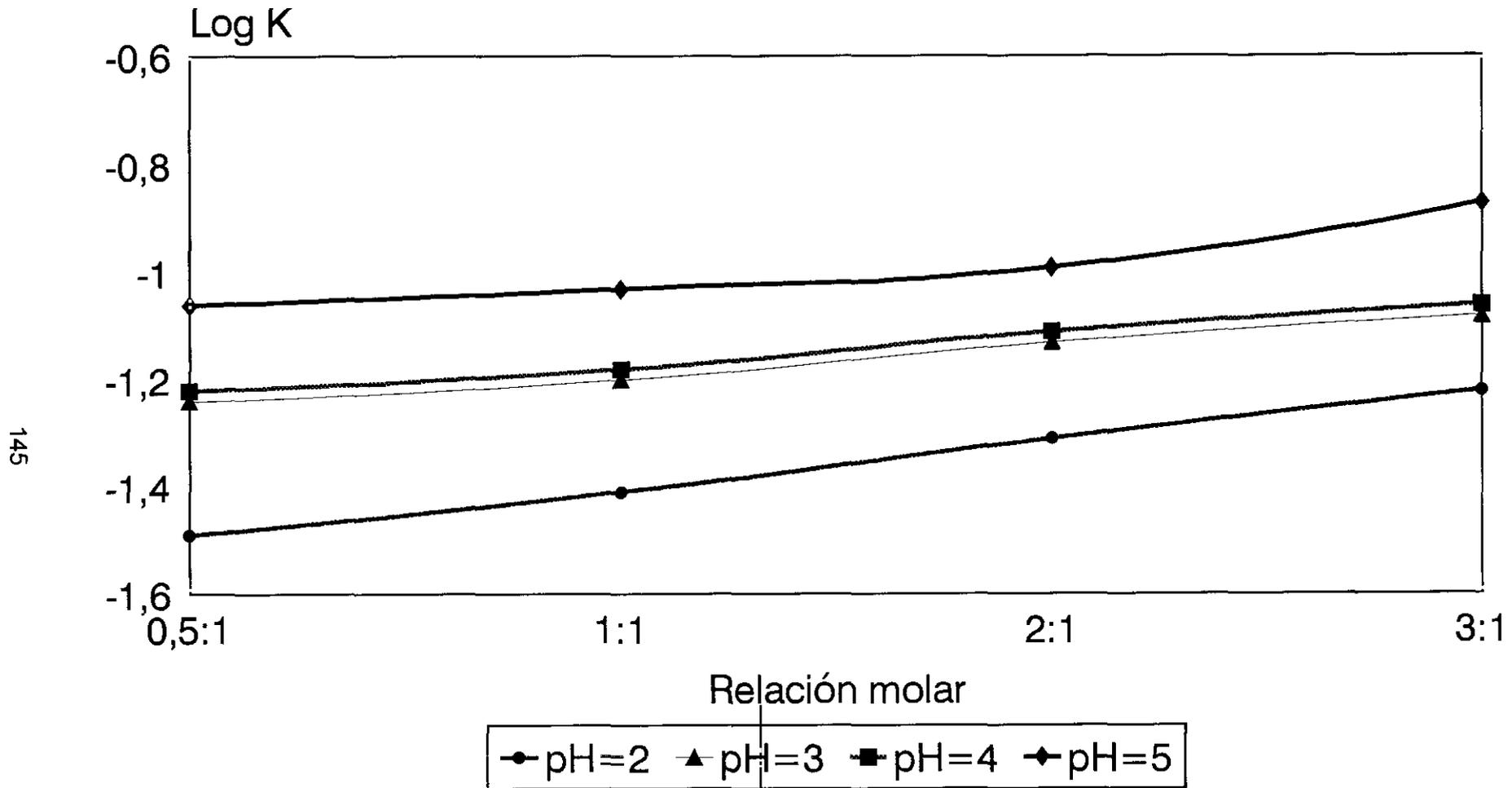


Figura 73.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

T=50 °C

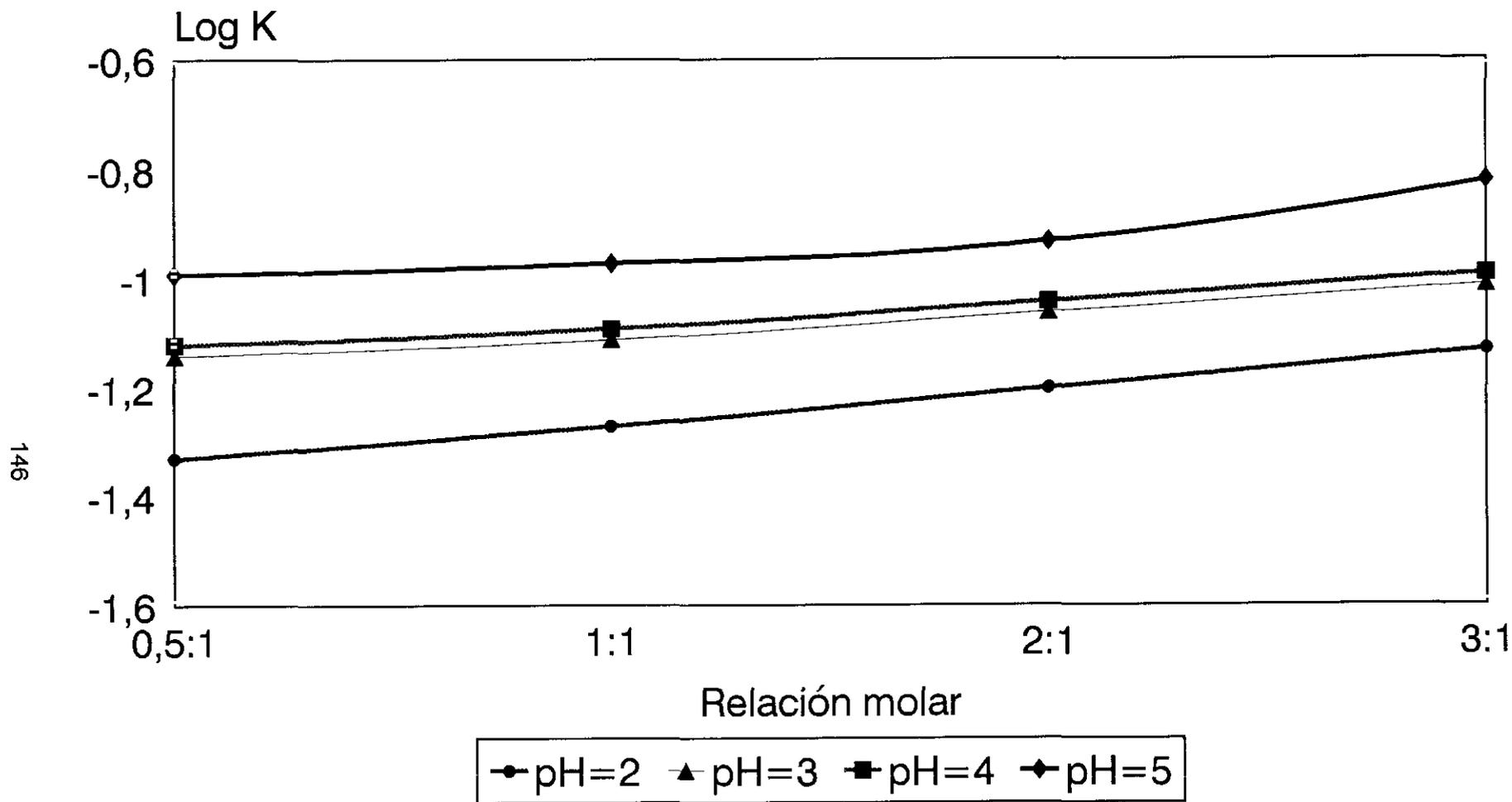
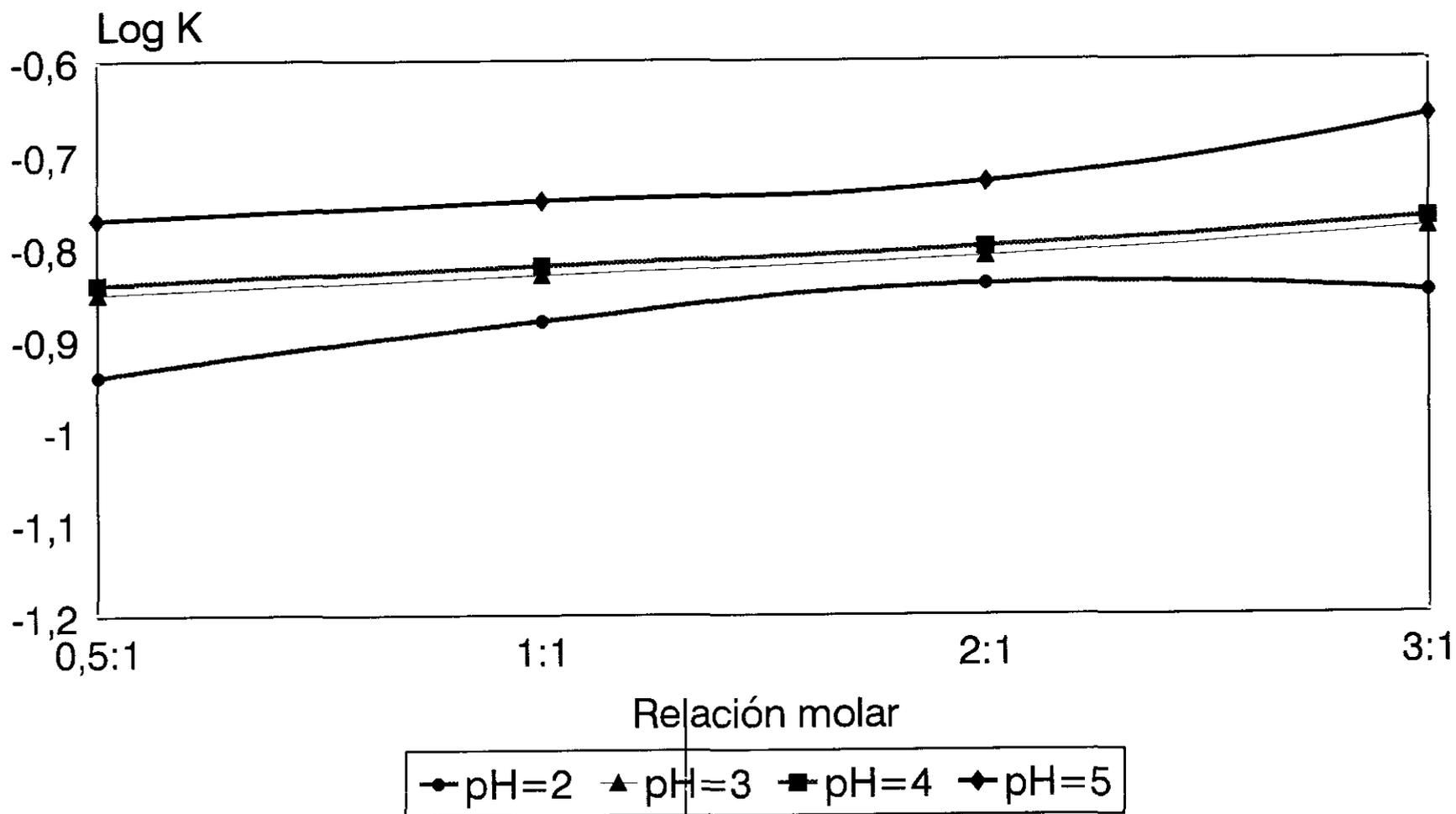


Figura 74.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

T=60 °C

147



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 75.- Representación del log K obs. frente a las relaciones molares.

no ha formado complejo, debe también catalizar la reacción de hidrólisis del complejo.

Adición de Níquel

La adición de Ni(II) a la Ceftizoxima, como hemos establecido anteriormente, no implica la formación de un complejo, sino que conduce a la formación de 7-desmetil ADCA y ácido tiazoxímico, como sucede cuando no se adiciona ion metálico, según la reacción :



Por tanto, en este caso, se trata de ver si la adición de Ni(II), incrementa o no la velocidad de la reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima.

Los valores de las pendientes y las ordenadas en el origen de las correspondientes rectas de regresión lineal, en los valores de pH de nuestro ensayo (2-8) y con las variaciones de Temperaturas efectuadas (30, 40 , 50 y 60 °C), se muestran en las Tablas XXIX (pendientes) y XXX (ordenadas en el origen), para el pico de tiempo de retención 1,66 min.

Orden de la Reacción

El orden de la reacción de hidrólisis asignado en este caso es de nuevo el orden uno. Los valores de los coeficientes de regresión lineal a 30 °C, se muestran en la Tabla XXXI.

Tabla XXIX.- Pendientes de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH	T=30°C	T=40°C	T=50°C	T=60°C
2	-12,05	-13,29	-14,4	-17,11
3	-7,572	-9,323	-10,94	-14,79
4	-4,156	-6,347	-11,24	-13,21
5	-6,496	-8,386	-10,14	-14,3
6	-4,463	-6,498	-8,406	-12,88
7	-2,445	-4,772	-6,963	-12,09
8	-1,99	-4,394	-6,658	-11,95

Tabla XXX.- Ordenadas en el origen de las rectas obtenidas a partir de los datos de concentraciones frente al tiempo.

pH	T=30°C	T=40°C	T=50°C	T=60°C
2	99,54	99,35	98,48	97,64
3	98,22	98,43	97,92	97,93
4	98,83	99,37	104,4	99,83
5	98,53	98,83	98,4	98,61
6	94,49	94,94	94,69	95,24
7	97,44	98,05	97,89	98,75
8	98,46	99,1	98,97	99,91

Tabla XXXI.- Coeficientes de Regresión lineal a T=30°C.

T=30 °C

pH	ORDEN 0	ORDEN 1	ORDEN 2
2	-0,996	-0,99	0,974
3	-0,995	-0,998	0,998
4	-0,902	-0,901	0,899
5	-0,985	-0,99	0,993
6	-0,904	-0,915	0,925
7	-0,925	-0,931	0,936
8	-0,945	-0,949	0,952

Influencia del pH

Las rectas de regresión lineal obtenidas con los valores del log C frente al tiempo, en los distintos valores de pH ensayados (2-8), manteniendo fija la temperatura, se muestran en las figuras 76 a 79. En todas ellas, se manifiestan menores pendientes en el pH 2, mientras que los mayores valores de esta, se corresponden con los de pH 7 y 8, lo que indica, como en la Ceftrizoxima sin adición de iones, una mayor degradación a pH 2 y una menor a pH 7-8.

En la Tabla XXXII, se dan los valores de las constantes observadas en los valores de pH 2 a 8 y a las temperaturas ensayadas.

Tabla XXXII.- Constantes observadas de orden uno en la reacción de hidrólisis de la Ceftrizoxima.

T °C	pH=2	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8
30	0,175	0,094	0,046	0,077	0,052	0,026	0,021
40	0,203	0,122	0,074	0,105	0,08	0,055	0,049
50	0,233	0,152	0,104	0,136	0,11	0,085	0,08
60	0,323	0,242	0,194	0,226	0,2	0,175	0,169

T=30 °C

152

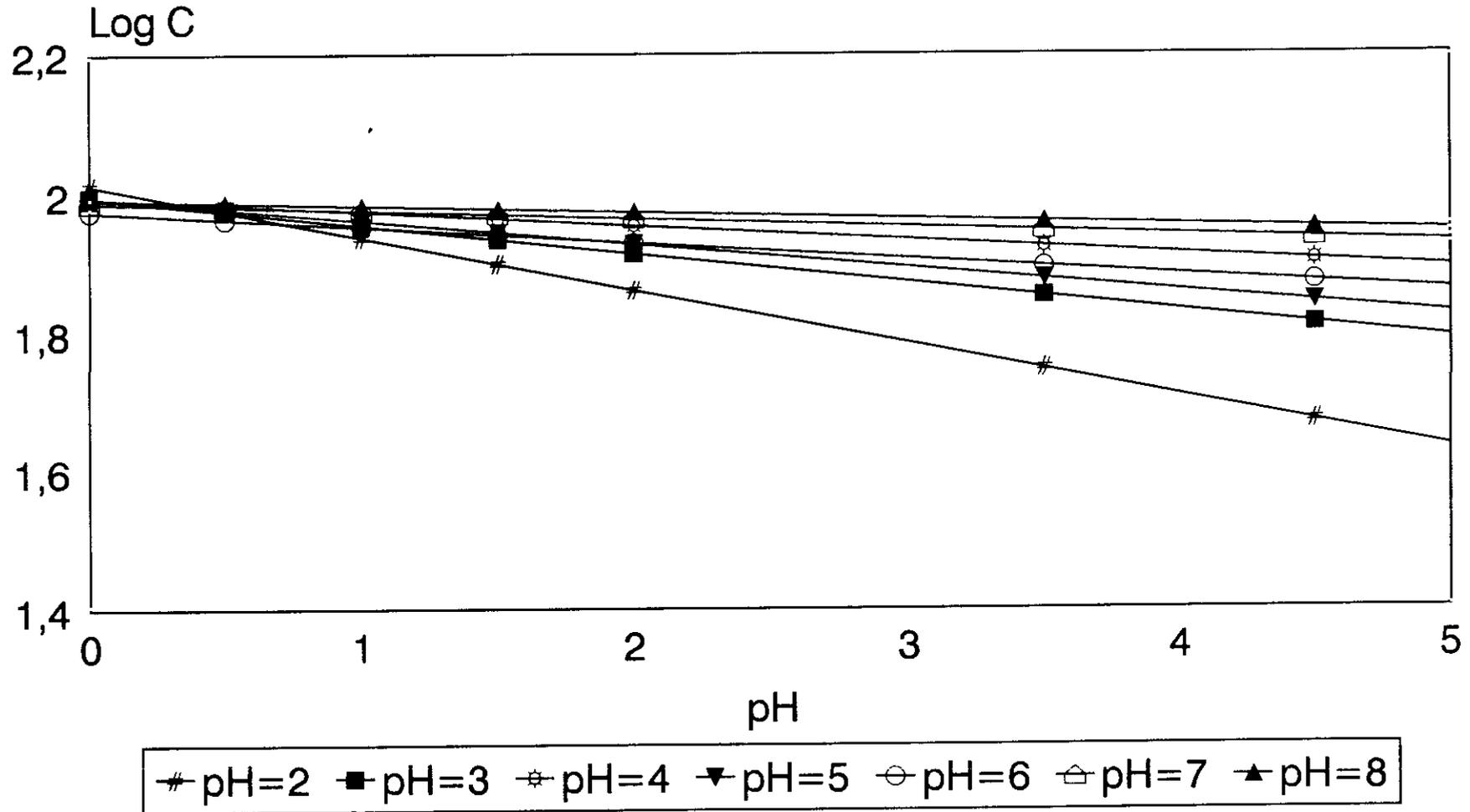


Figura 76.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH .

T=40 °C

153

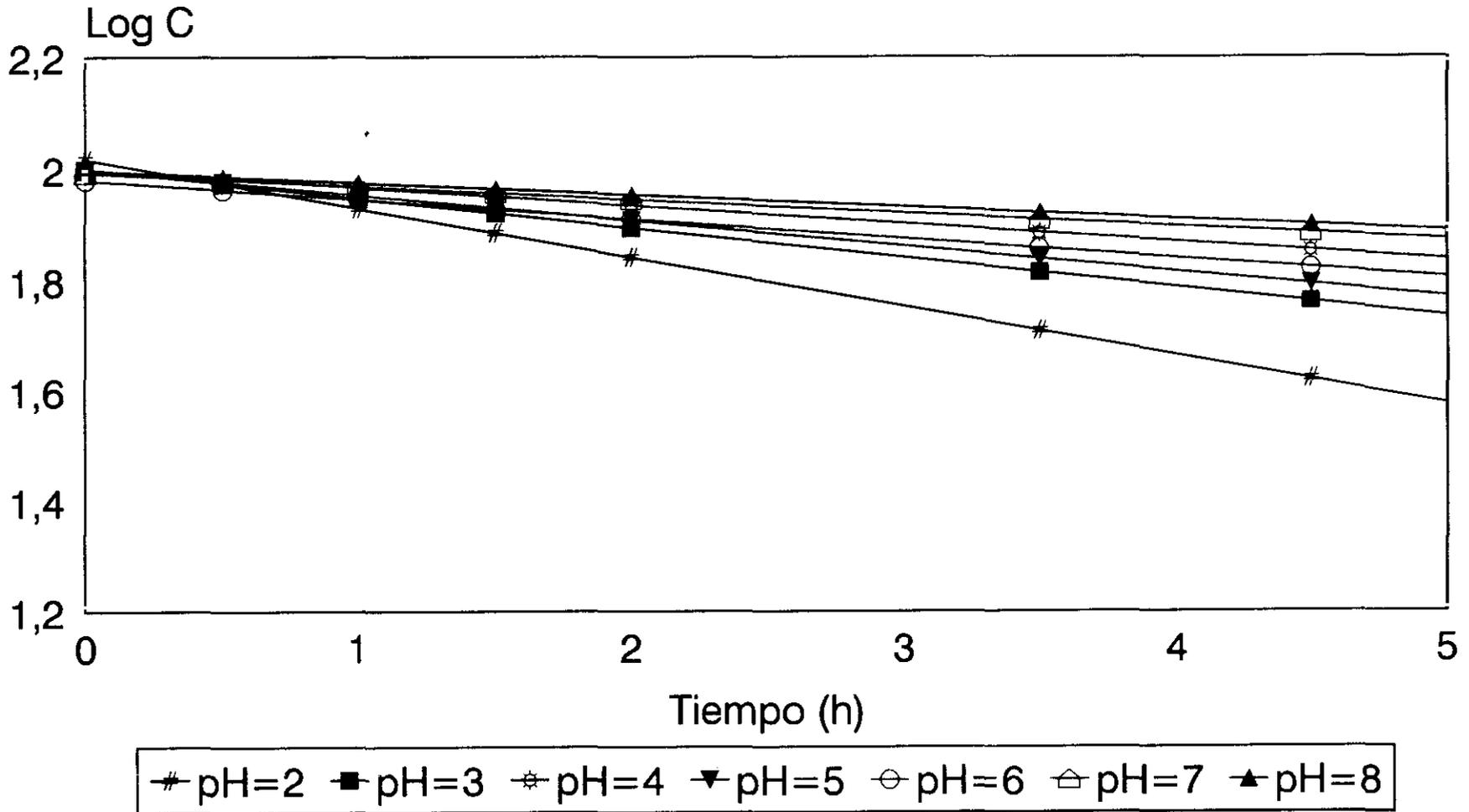


Figura 77.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH .

T=50 °C

154

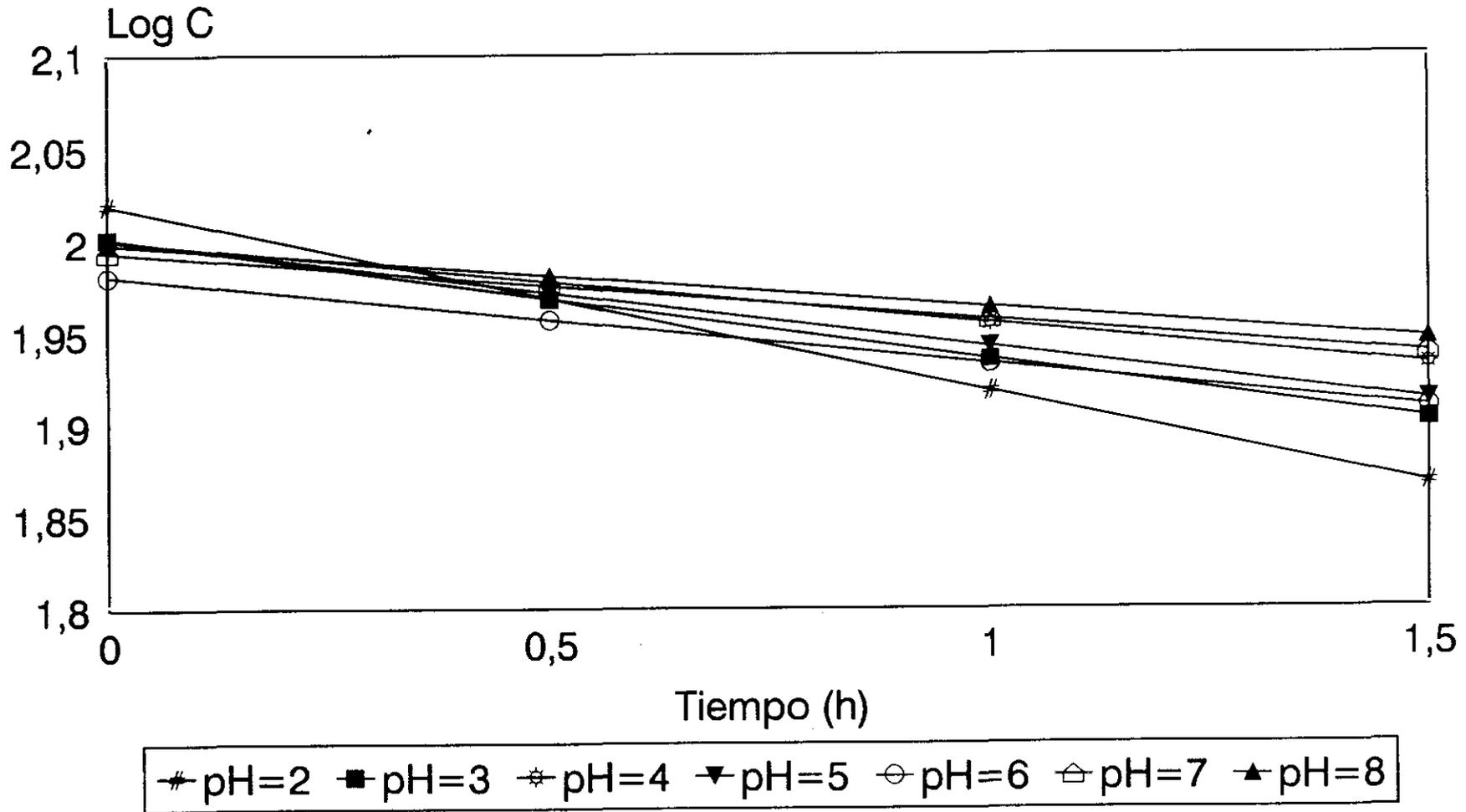


Figura 78.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH .

T=60 °C

155

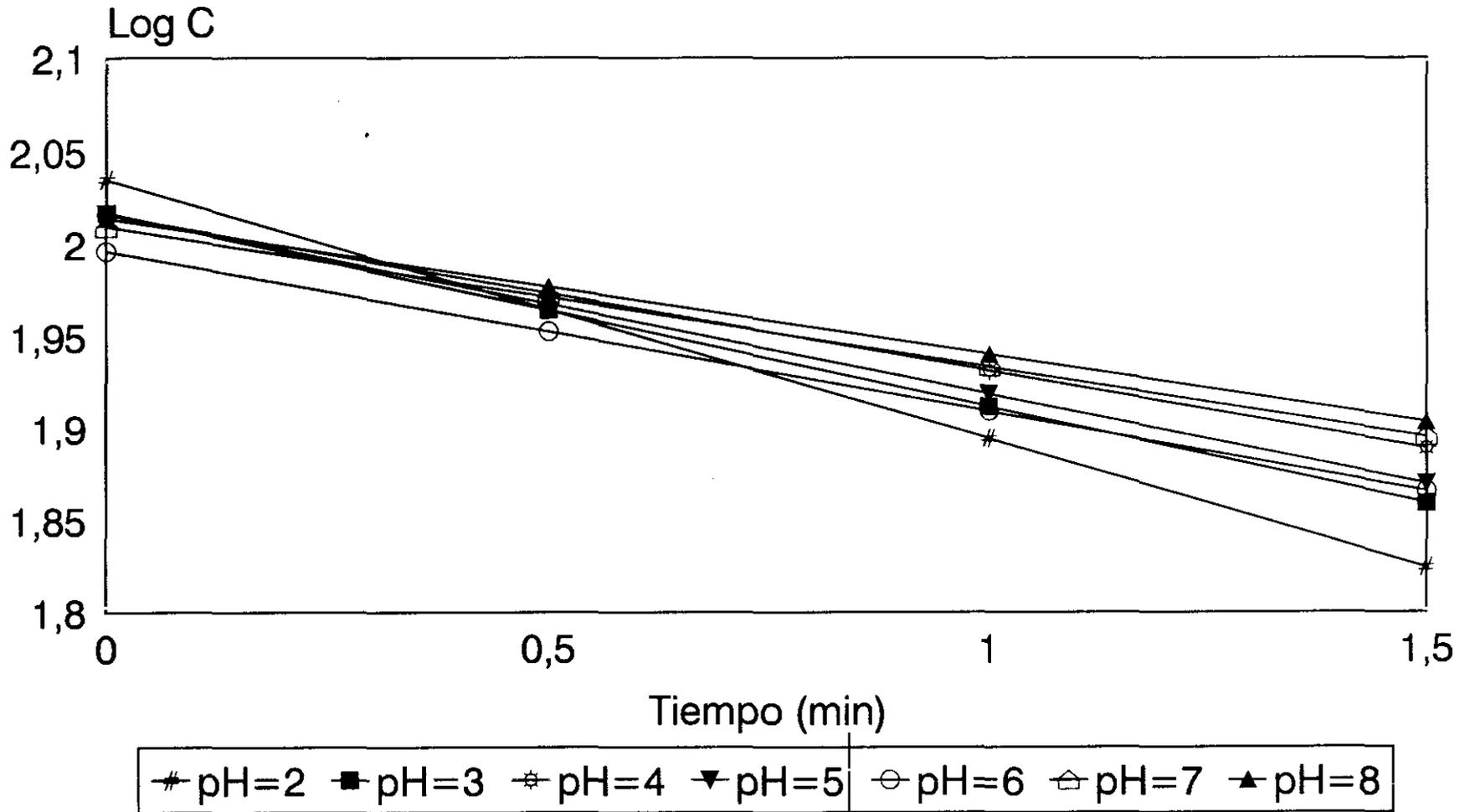


Figura 79.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes pH .

En la representación del log de las K observadas frente a los valores de pH ensayados, obtenemos la gráfica de la figura 80, en donde se pueden apreciar dos puntos de inflexión, como sucede en la Cefprozil sin adición, que resultan idénticos, siendo la degradación es máxima en los valores de pH más ácidos (2-5), con un punto de inflexión a pH=4, donde la degradación de la Cefprozil es inferior al pH=5, disminuyendo en los valores de pH alcalinos o neutros (7-8).

Por tanto se puede establecer, que cuando se adiciona Ni(II) a la Cefprozil, la degradación es similar, ya que la curva de hidrólisis obtenida en ambos casos, al representar el log K frente al pH es idéntica y los valores de las constantes observadas son similares, tal como se muestra en la siguiente Tabla a 30 °C:

pH	Cefprozil	Cefprozil + Ni
2	0,172	0,175
3	0,091	0,094
4	0,044	0,046
5	0,075	0,077
6	0,05	0,052
7	0,024	0,026
8	0,019	0,021

por lo que la adición de Ni, no conduce a un efecto catalítico en la reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima.

Influencia de la temperatura

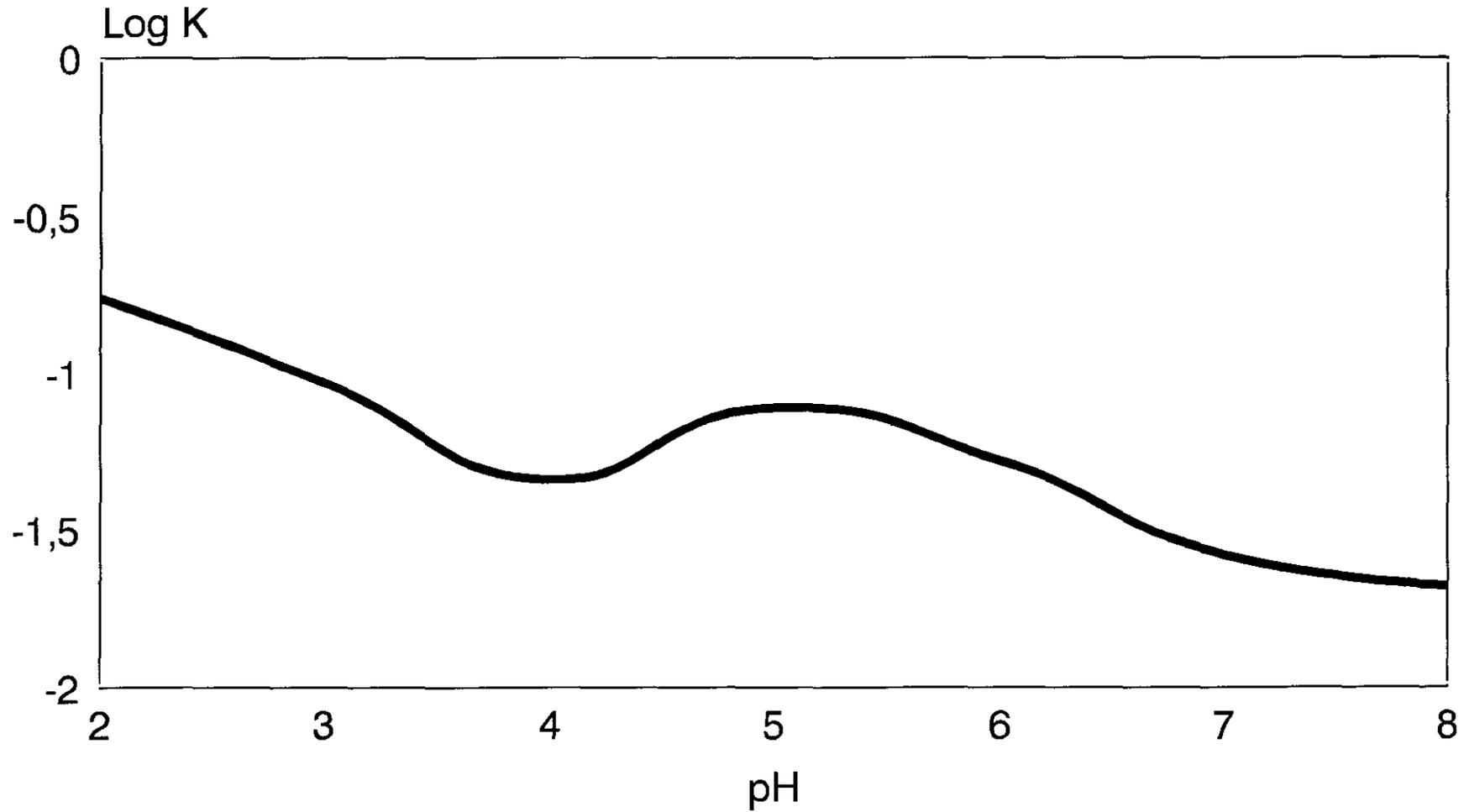
De nuevo, se observa una menor degradación a menor temperatura, para ir incrementando según la aumentamos, tal como se muestra en la figura 81 a pH 2.

Las correspondientes rectas de Arrhenius, se muestran en la figura 82, en los distintos valores de pH, mientras que las Energías de Activación, se dan en la Tabla XXXIII, en donde se observa que sigue un orden:

$$\text{pH } 2 < 3 < 5 < 6 < 4 < 7 < 8$$

similar al obtenido con la Ceftizoxima sin adición de iones metálicos.

T=30 °C



158

Figura 80.- Representación del $\log K$ obs. frente al pH.

pH 2

159

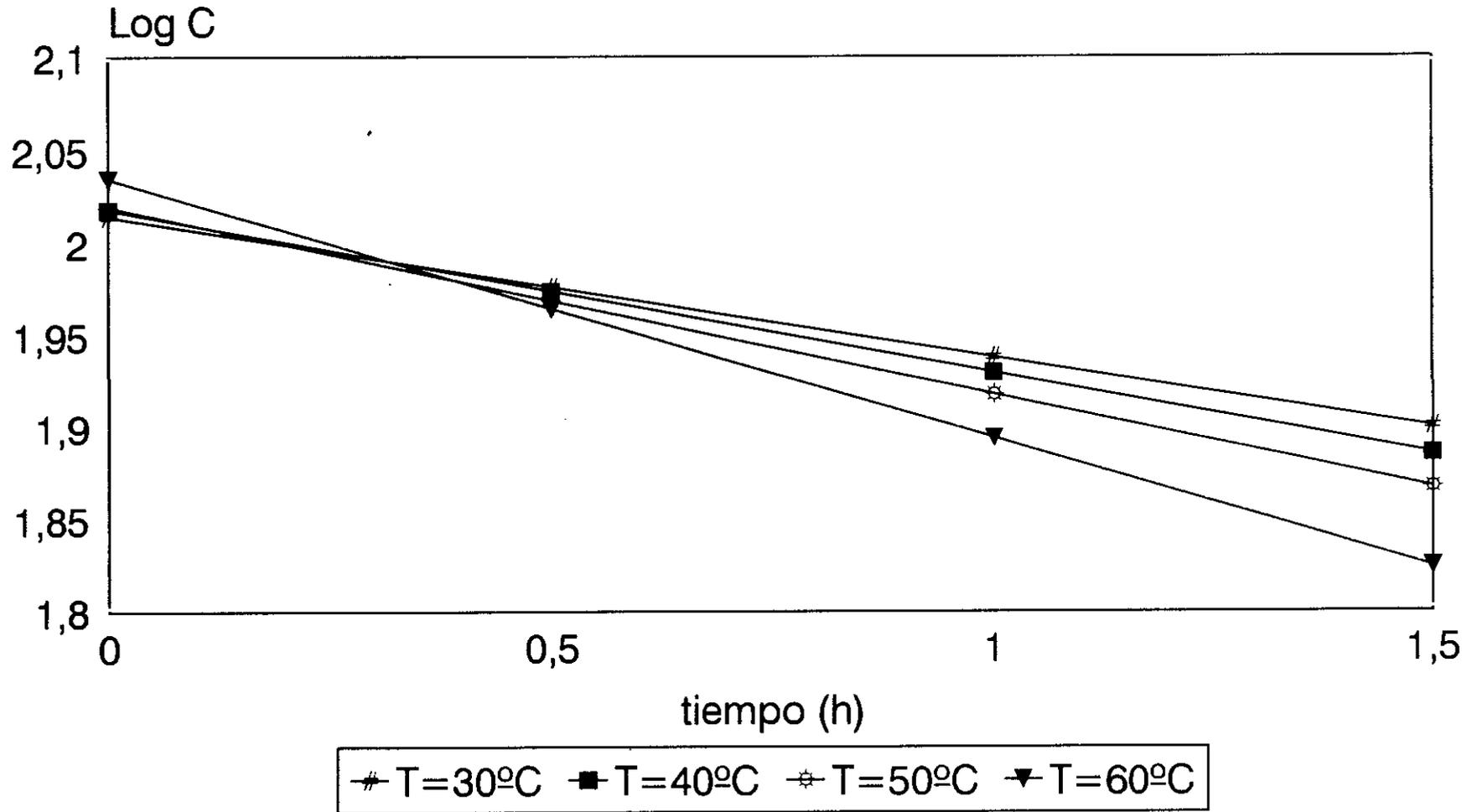


Figura 81.- Representación del Log C frente al tiempo a diferentes temperaturas.

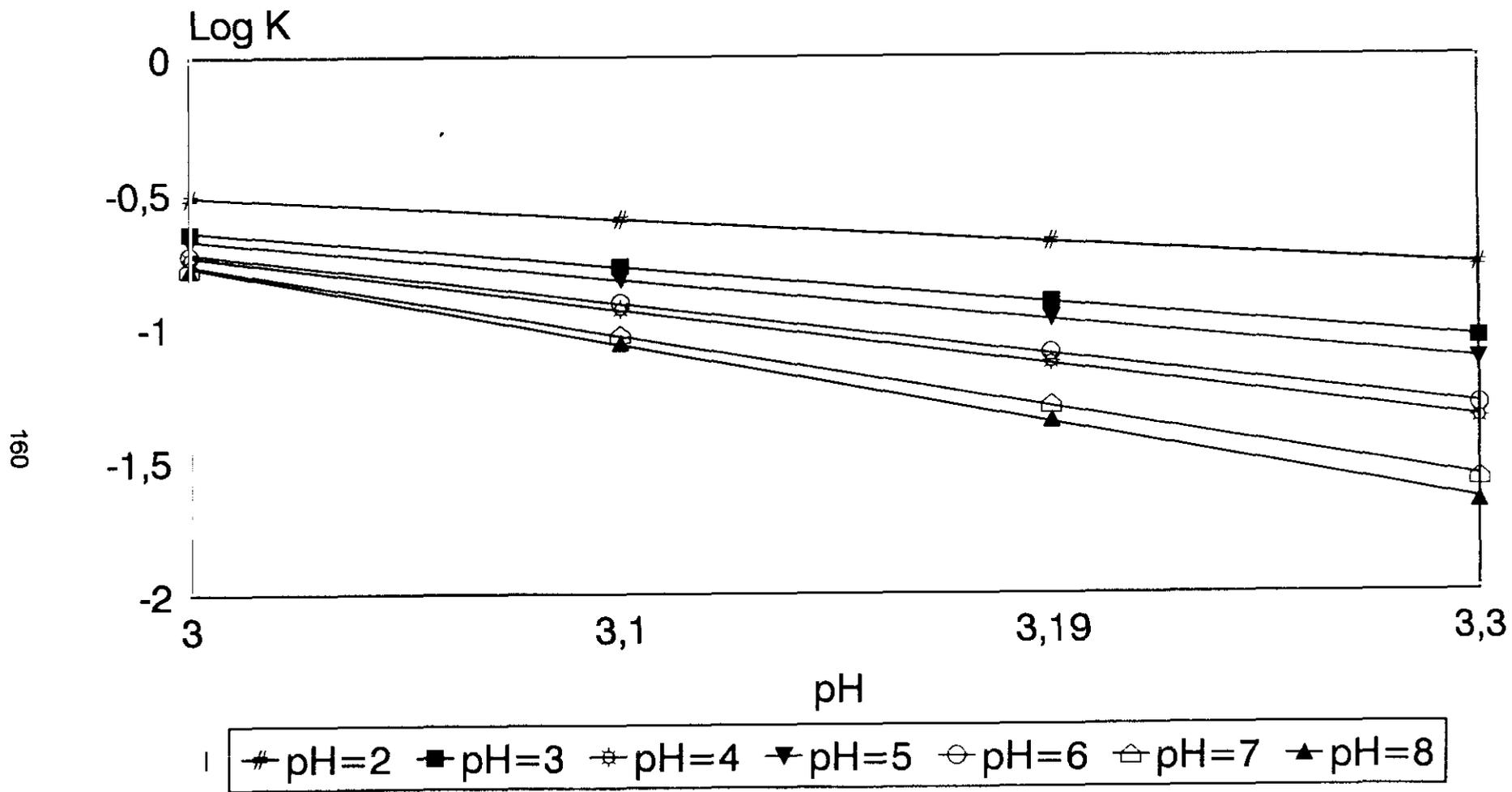


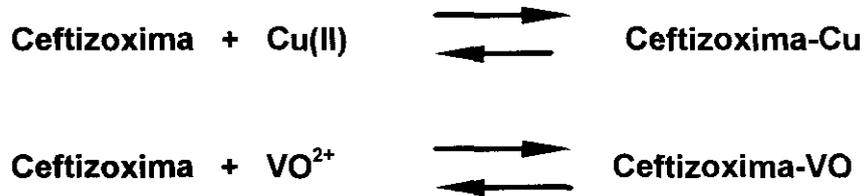
Figura 82.- Representación de Arrhenius.

Tabla XXXIII.- Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius (kcal/mol).

pH	Ea
2	3,95
3	6,13
4	9,34
5	6,93
6	8,74
7	12,26
8	13,52

REACCIONES DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS

Las reacciones de formación de estos complejos metálicos con la Cefitioxima:



implican un equilibrio químico, con una constante K_e , según la ecuación:

$$K_e = \frac{[\text{Cefitioxima-Me}]}{[\text{Cefitioxima}][\text{Me}]}$$

donde la $[\text{Cefitioxima}]$, es la concentración inicial de Cefitioxima, en nuestro caso 0,5 mg/mL (1,26 mM), obtenida aislando el pico de tiempo de retención 1,66 min. que corresponde al isómero mayoritario por recolección de la fracción correspondiente; $[\text{Me}]$, es la concentración de Cu(II) o de VO^{2+} que no han reaccionado, y la $[\text{Cefitioxima-Me}]$, es la concentración del complejo metálico.

La concentración del metal inicial es de 0,2 mM, y la residual se ha determinado por cromatografía iónica por el método descrito anteriormente y la del complejo metálico, a partir de un patrón de Cefitioxima-Cu o Cefitioxima-VO, aislado recolectando la fracción cromatográfica correspondiente a los picos de tiempos de retención 8,14 y 7,1 min., respectivamente, y posteriormente disueltos en Metanol a concentraciones de 1, 1,05, 1,1 y 1,2 mM y cuyas rectas de calibrado

se dan en las figuras 83 y 84. Las correspondientes concentraciones del complejo, con los valores obtenidos del $\log K_e$, se muestran en las Tablas XXXIV (Ceftizoxima-Cu) y XXXV (Ceftizoxima-VO), en los distintos valores de pH ensayados. En ellas, se observan valores semejantes del $\log K_e$ en ambos complejos, con una tendencia a ir disminuyendo conforme aumenta el pH (2 a 5), siendo similares en los valores de pH 3 y 4, por lo que la estabilidad del complejo es mayor a pH muy ácidos y va disminuyendo con los valores de pH menos ácidos, tal como sucede en cuanto a los valores obtenidos de las K observadas en la *reacción de hidrólisis*.

A partir del $\log K_e$, se pueden determinar las constantes termodinámicas de la reacción de formación del complejo, según las ecuaciones:

$$\Delta G = -2,303.R.T.\log K_e$$

$$\log K_{e2} - \log K_{e1} = \frac{\Delta H}{2,303.R} \times \frac{(T_2 - T_1)}{(T_1 T_2)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T. \Delta S$$

cuyos valores se muestran así mismo en las Tablas XXXIV y XXXV, donde se aprecian valores de ΔS , superiores a 100 J/mol, lo que indica la formación de un quelato, cuyos valores máximos se alcanzan a pH 2, lo que indica de nuevo, una mayor estabilidad en este pH.

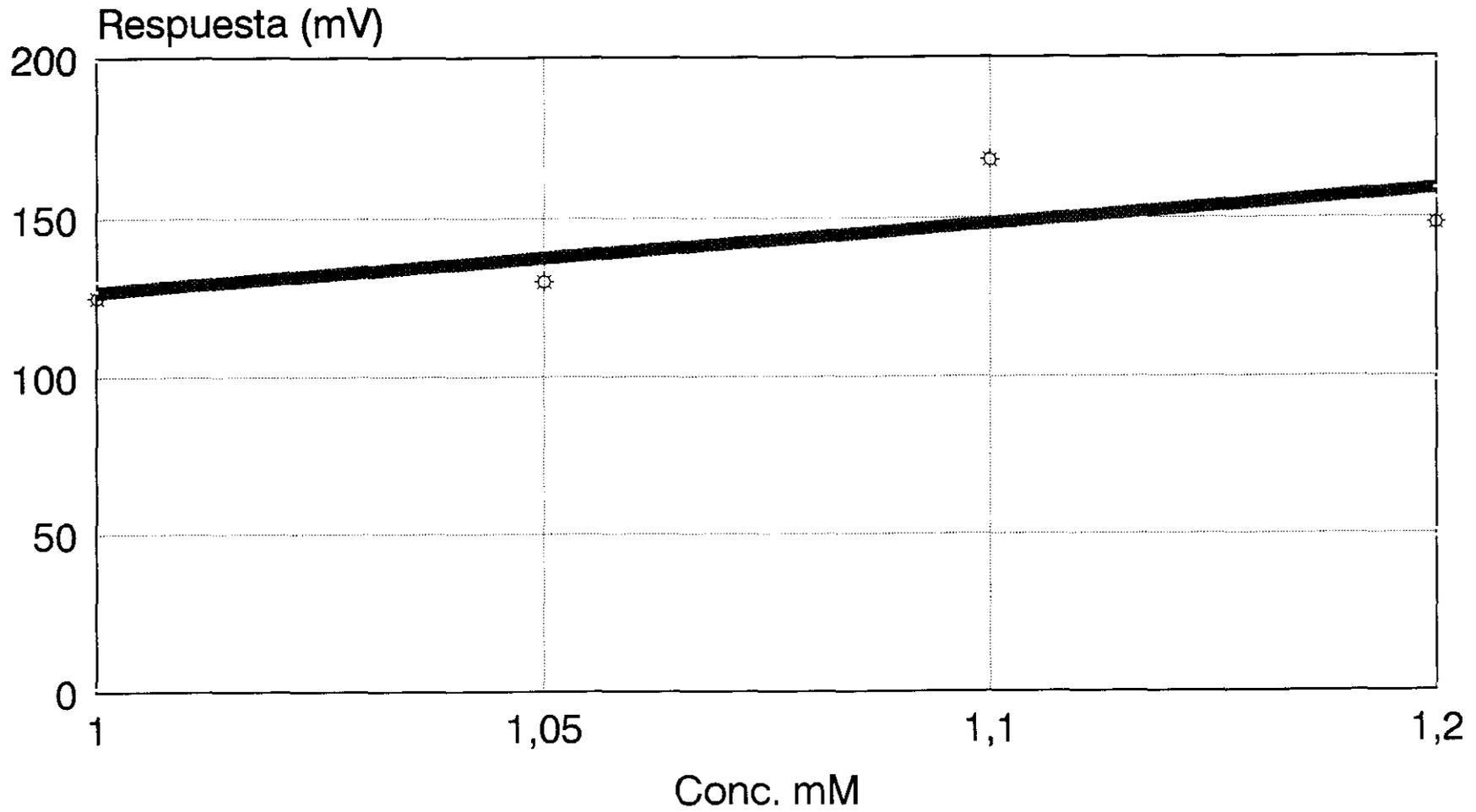


Figura 83.- Recta de Calibrado del patrón de Ceftizoxima-Cu.

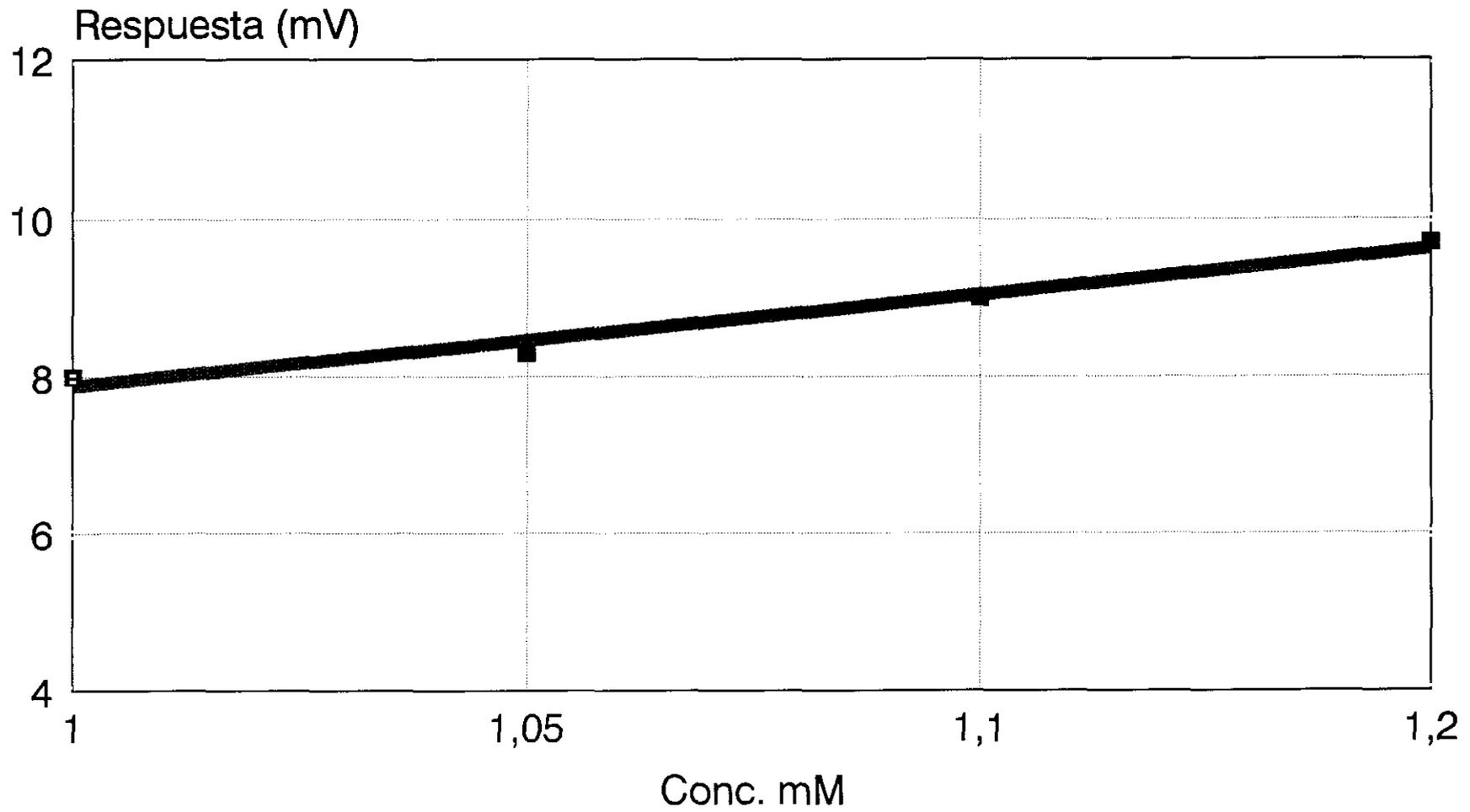


Figura 84.- Recta de Calibrado del patrón de Cefprozima-VO.

Tabla XXXIV.- Valores obtenidos del log Ke y constantes termodinámicas en el complejo Ceftizoxima-Cu(II). ΔG y ΔH en KJ/mol y ΔS en J/mol.

pH	[Ceftizoxima-Cu]	log Ke	ΔG	ΔH	ΔS
	T=30°C	T=30°C			
2	0,93	2,53	-3,5	40,64	137,63
3	1,05	2,42	-3,35	41,32	139,73
4	1,06	2,42	-3,35	39,3	133,05
5	1,1	2,46	-3,41	37,65	127,66
	T=40°C	T=40°C			
2	1,38	2,74			
3	1,35	2,63			
4	1,33	2,63			
5	1,27	2,66			

Tabla XXXV.- Valores obtenidos del log Ke y constantes termodinámicas en el complejo Ceftizoxima-VO. ΔG y ΔH en KJ/mol y ΔS en J/mol.

pH	[Ceftizoxima-VO]	log Ke	ΔG	ΔH	ΔS
	T=30°C	T=30°C			
2	0,91	2,52	-3,48	43,64	147,51
3	1,064	2,42	-3,35	41,32	139,74
4	1,07	2,42	-3,36	39,76	134,57
5	1,143	2,48	-3,44	38,3	129,83
	T=40°C	T=40°C			
2	1,4	2,74			
3	1,368	2,64			
4	1,35	2,63			
5	1,33	2,68			

CONCLUSIONES

1.- La Ceftizoxima, sigue una ruta hidrolítica, en los valores de pH ensayados (2-8), que conduce a la formación de 7-desmetil ADCA y ácido tiazoxímico, que es la habitual en las desacetoxicefalosporinas.

2.- La adición de Cu(II) y de VO²⁺, produce un complejo en disolución acuosa con la Ceftizoxima, en los valores de pH 2-5, mientras que en la de Ni(II), no se observa la formación de un quelato estable.

3.- Los complejos Ceftizoxima-Cu y Ceftizoxima-VO, son de tipo hidrolítico, y por ataque nucleofílico de una molécula de agua o por el anión hidroxilo, se produce la ruptura del anillo β -lactama, con formación de otro complejo con el correspondiente derivado del ácido Cefaloico. En los valores de pH 2-4, se produce además, otro complejo, con el 7-desmetil ADCA, producto de hidrólisis de la Ceftizoxima, lo que debe implicar una ruptura parcial de esta antes de formar el complejo.

4.- La estequiometría de los complejos Ceftizoxima-Cu y Ceftizoxima-VO resulta ser 1:1.

5.- Todas estas reacciones hidrolíticas transcurren previsiblemente en orden uno o pseudo orden uno.

6.- La reacción de hidrólisis de la Ceftizoxima es más rápida a pH muy ácidos (2-5), con un punto de inflexión a pH=4, donde la degradación es menor, y es más estable en los valores de pH neutros o alcalinos (7-8).

7.- Cuando se adiciona Ni(II) a la Ceftizoxima, no se producen alteraciones significativas ni en el perfil indicado anteriormente, ni en el valor de las constantes cinéticas de orden uno observadas, por lo que se puede concluir que no produce ningún efecto de catálisis.

8.- Sin embargo, los complejos Ceftizoxima-Cu y Ceftizoxima-VO, conducen a una ruptura hidrolítica del anillo β -lactama, que es más intenso a pH 5 y menor a pH 2, apreciándose por los valores de las K observadas, una situación de mayor estabilidad en los valores de pH más ácidos (2-3) en el complejo con respecto a la Ceftizoxima.

9.- La concentración de ion Cu(II) y VO²⁺, influye en la estabilidad del complejo, observándose una menor estabilidad conforme se incrementa dicha concentración, por lo que el Cu(II) o VO²⁺, que no ha formado complejo debe catalizar también la reacción de hidrólisis de este.

10.- Los valores de las Energías de Activación obtenidas de la ecuación de Arrhenius son concordantes con las estabilidades deducidas por los valores de las K observadas.

11.- Los valores de ΔS , superiores a 100 J/mol, deducidos a partir de las constantes de equilibrio de las reacciones de formación de los complejos, están de acuerdo con la formación de un quelato estable.

12.- Los valores de los log K_e, obtenidos en las reacciones de formación de los complejos metálicos, indican una mayor estabilidad en el pH 2.

BIBLIOGRAFÍA

(1).Turck, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, 10, Suppl. C, 339-345.

(2).C. Avendaño. Introducción a la Química Farmacéutica. pag. 322-331.
Ed.Interamericana-Mc. Graw-Hill. 1993.

(3).G.L. Dunn, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, 10, Suppl. C 1-10.

(4).W.J. Gottstein, M.A, Kaplan, J.A. Cooper, V.H. Silver, S.J. Nachfolger y A.P. Granatek, *Journal of Antibiotics*.1976, 29, 1226-9.

(5).J.R.E. Hoover y G.L. Dunn, *Burger's Medicinal Chemistry*.1979, 83-172.

(6).C.H. O'Callaghan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1979, 5, 635-71.

(7).T. Kamimura, Y. Matsumoto, Y. Shigi y M. Nishida, *Arzneim-Forsch*. 1980, 30, 1662-1687.

(8).K.P. Fu y H.C. Neu, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.1980, 17, 583-90.

(9).R. B. Sykes y M. Matthew, *Journal of Antibiotical Chemotherapy*. 1976, 2, 115-57.

(10).P. Actor y S.F. Grappel, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, 10,Suppl C, 81-9.

- (11).M. H. Richmond y R. B. Sykes, *Advances in Microbial Physiology*. 1973, **9**, 31-85.
- (12).M. H. Richmond y N.A.C. Curtis, *Annals of New York Academy of Sciences*. 1974, **235**, 553-68.
- (13).H. Aoki y M. Okuhura, *Annual Review of Microbiology*. 1980, **34**, 159-81.
- (14).T.V. Dougherty, G. E. Koller y A. Tomasz, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **18**, 730-7.
- (15).N.H. Georgopapadakou y F.Y. Liu, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **18**, 148-57.
- (16).H. Kojo, Y. Shigi y M. Nishida, *Journal of Antibiotics*.1980, **33**, 310-6.
- (17).L. Levie, *Annals of New York Academy of Sciences*. 1974, **235**, 109-29.
- (18).H.C. Neu, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1969, **32**, 258-63.
- (19).H.C. Neu, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.1974, **6**, 170-6.
- (20).H. Nikaido y T. Nakae, *Advance in Microbial Physiology*. 1979, **20**,163-250.
- (21).M. H. Richmond, P. M. Benett, C. L. Choi, D. Brown, J. Brunton, J. Grinsted y L. Wallace, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1980, **B289**, 349-59.

(22).T. Sawai, K. Matsuba, A. Tamura y S. Yamagishi, *Journal of Antibiotics*. 1980, **32**, 59-65.

(23).B. G. Spratt, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1977, **72**, 2999-3003.

(24).S. Tamaki, S. Nakajima y M. Matsushashi, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1977, **74**, 5472-6.

(25).D. J. Tipper y J.L. Strominger, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1965, **54**, 1133-41.

(26). A. Tomasz, *Annual Review of Microbiology*. 1979, **33**, 113-41.

(27).R. Willianson, R. Hakenbeck y A. Tomasz, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **18**, 629-37.

(28).W. Zimmerman y A. Rosselet, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1977, **12**, 368-72.

(29).H.C. Neu, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, **10**, Suppl C, 11-23.

(30).B. Hartman y A. Tomasz, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1981, **19**, 726-35.

(31). H. Kojo, Y. Shigi y M. Nishida, *Journal of Antibiotics*.1980, **33**, 317-21.

- (32).K. Morita, H. Normura, M. Numata, M. Ochiai y M. Yoneda, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1980, **B289**, 181-90.
- (33).N.H. Georgopapadakou y F.Y. Liu, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1980, **18**, 834-6.
- (34).M.H. Richmond, D. C. Clark y S. Wolton, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1973, **10**, 215-7.
- (35).D. Greenwood, N. Pearson, A. Eley y F. O'Grady, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **17**, 397-401.
- (36).T. Kamimura, Y. Matsumoto, N. Okada, Y. Mine, M. Nishida, S. Goto y S. Kuwahara, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1979, **16**, 549-53.
- (37).M. Nishida, T. Mamimura, N. Okada, Y. Matsumoto y T. Murakawa, *Journal of Antibiotics*. 1979, **32**, 1319-27.
- (38).A. Eley y D. Greenwood, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1981, **20**, 332-5.
- (39).R. W. Ryan, Y. Kwasnik y R. C. Tilton, *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 1982, **12**, 32-4.
- (40).F. P. Tally, J. P. O'Keefe, N. M. Sullivan y S. L Gorbach, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1979, **16**, 565-71.

(41).H. C. Neu y S. Srinivasan, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1981, **20**, 366-69.

(42).C. Kim, D. G. Schick, M.A. Ashley y J. Z. Montgomerie, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, **10**, Suppl. C 57-62.

(43).R. J. Fass, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1982, **21**, 1003-6.

(44).R. C. Moellering Jr, S. Willey y G. M. Eliopoulos, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, **10**, Suppl. C 69-79.

(45).A. Bauernfeind, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1981, **8**,Suppl B, 111-7.

(46).N. A. Kuck, R.T. Testa y M. Forbes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1981, **19**, 634-8.

(47).D. M. Richards, R. C. Heel, R. N. Brodgen, T.M. Speight y G.S. Avery, *Drugs*. 1984, **27**, 469.

(48).R.N. Jones y A.L. Barry, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1987, **31**, 818.

(49).R. E. Cultler, A.D. Blair, E. D. Burgess y D. Parks, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1982, **10**,Suppl C, 91-97.

- (50).T. Murakawa, H. Sakamoto, S. Fukada, S. Nakamoto, T. Hirose, N. Itoh y M. Nishida, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **17**, 157-64.
- (51).P.G. Sammers y J.B. Taylor (Ed.). *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Vol.II. **9**. pag.636. Pergamon Press. USA.1990.
- (52).H. J. Rooth y A. Kleeman (Ed.). Ellis Horwood Ser. in Pharmaceutical Technology and Pharmaceutical Chemistry. **5**,pag. 256. 1992.
- (53).H. C. Neu, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.1982, **10**,Suppl C, 193-9.
- (54).C. H. O'Callaghan y J. Elks, en *Encyclopedia of Chemical Technology*. R.E. Kirk y D. F. Othmer(Ed.). pag. 64. Wiley & Sons. New York. 1984.
- (55).Y. Shigi, H. Kojo, M. Wakasugi y M. Nishida, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1981, **19**, 393-6.
- (56).H. Nakano, *Medicinal Research Reviews*. 1981, **1**, 127-57.
- (57).C.H. O'Callaghan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1979, **5**, 635-71.
- (58).M.I. Page, *Acc. Chem. Res*. 1984, **17**, 144-51.
- (59).T. Takaya, H. Taksugi, T. Masugi, T. Chiba, H. Kochi y T. Takano, *Nippon Kagaku Kaishi, Chem. Abstract*. 1981, **95**, 150-563.
- (60).R. Wise y col., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980, **17**, 84.

-
- (61).R.M. Herriot, *J. Biol. Chem.* 1946, **164**, 725.
- (62).A. Holbrook, *J. Pharm. Pharmacol.* 1958, **10**, 762.
- (63).F.G. Stock, *Analyst.* 1954, **79**, 662.
- (64).M.W. Brandirss, E.L. Denny, A.M. Huber y H.G. Steinman, *Antimic. Ag. Chemeoter.* 1962, 626.
- (65).W.J. Weaver y R.F. Reschke, *J. Pharm. Sci.* 1963, **52**, 362.
- (66).J.W. Smith, G. de Gray y V.J. Patel, *Analyst.* 1967, **92**, 247.
- (67).C. Yasuda y S. Shimada, *J. Antibiotics.* 1971, **24**, 291.
- (68).H. Fabré, M.D. Blanchin, D. Lerner y B. Mandrou, *Analyst* (London). 1985, **110**, 775.
- (69).H. Fabré y N. Hussam, *J. Pharm. Pharmacol.* 1982, **34**, 425-8.
- (70).J.F. Alicino, *Ind. Eng. Chem. Anal.* 1946, **18**, 619.
- (71).T. Canbach, I. E. Erlen , F. Ilver y S. Webser, *J. Pharm. Pharmacol.* 1950, **2**, 364.
- (72).P.J. Weiss, *J. Antibiot. Chemoterapy.* 1959, **9**, 660.

- (73).D.C. Grove y W.A. Randall, *Assay Methods of Antibiotics. Medical Enciclopedia*. New York. 16, 1955.
- (74).J.H. Ford, *Anal.Chem.* 1947, **19**, 1004.
- (75).G.E. Boxer y P.M. Everett, *Anal. Chem.* 1949, **21**, 670.
- (76).H. Fabré y W. Th. Kok, *Analytical Chemistry*. 1988, **60**, 137.
- (77).H. Fabré, M.D. Blanchin, U.R. Tjaden, *Analyst* (London). 1986, **111**, 1281.
- (78).S.J. Patterson y N.B. Emery, *Analyst*. 1948, **73**, 207.
- (79) British Pharmacopeia. 1968.
- (80).H. Fabré, N. Hussam y G. Berge, *J. Pharm. Sci.* 1984, **73**, 611.
- (81).M.C. Rouan, *Journal of Cromatography*. 1985, **340**, 361-400.
- (82).C.E. Fasching, L.R. Peterson, K.M. Bettin y D.N. Gerding, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1982, **22**, 336-337.
- (83).G. Nygard y S.K. Wahba Khalil, *Journal of Cromatography*. 1984, **7**, 1461.
- (84).M. Lebel, J.F. Ericson y D.H. Pitkin, *Journal of Cromatography*. 1984, **7**, 961.
- (85).E.R. White y D. N. Laufer, *Journal of Cromatography*. 1984, **290**, 187.

- (86).S.A. Signs, T.M. File y J.S. Tan, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1984, **25**, 652-5.
- (87).Y. Wouters, S. Hendricks, E. Roets, J. Hoogmartens y H. Vanderhaeghe, *Journal of Cromatography*. 1984, **291**, 59-80.
- (88).S. Ting, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1988, **71**, 1123.
- (89).K. Miyazaki, K. Othani, K. Sunada y T. Arita, *Journal of Cromatography*. 1983, **276**, 478.
- (90).E. Crombez, G. Van der Weken, W. Van den Bossche y P. De Moerloose, *Journal of Cromatography*. 1979, **177**, 323.
- (91).M. C. Rouan, F. Abadie, A. Leclerc y F. Jugé, *Journal of Cromatography*. 1983, **275**, 133.
- (92).A.M. Brisson y J. B. Fourtillan, *Journal of Cromatography*. 1981, **223**, 393.
- (93).W.A. Cressman, E.T. Sugita, J.T. Doluisio y P.J. Niedergall.,*J. Pharm. Sci.* 1969, **58**, 1471.
- (94).A. Weiss, S. Fallab y M. Erlenmeyer, *Helv. Chim. Acta*. 1957, **40**, 611-4.
- (95).P.J. Niedergall, D.A. Hussar, W.A. Cressman, E.T. Sugita y J.T. Doluisio, *J. Pharm. Pharmacol.* 1966, **18**, 729-38.

- (96).W.A. Cressman y col., *J. Pharm. Sci.* 1969, **58**, 1471.
- (97).M. Mirasierra. *Tesis Doctoral*. Farmacia. Madrid. 1971.
- (98).A. Doadrio y M.G. Mirasierra, *An. Real Acad. Farm.* 1973, **39**, 183.
- (99).J. Sotelo. *Tesis Doctoral*. Farmacia. Madrid. 1988.
- (100). M. Iribarren. *Tesis Doctoral*. Farmacia. Madrid. 1989.
- (101).A.L.. Doadrio, J.C. Doadrio y M. Iribarren, *Ecl. Chim.* 1992, **17**, 41-52.