

615955539  
11976165X

13973-

T/884



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Facultad de Química

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DETERMINACIONES VOLTAMPEROMÉTRICAS DE LOS  
ANTIBIÓTICOS CEFMINOX E IMIPENEM

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Abdelilah Hilali'.

ABDELILAH HILALI

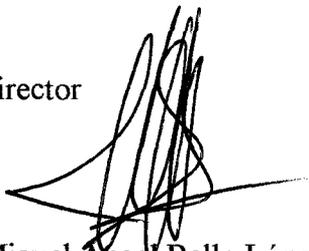
Sevilla 2003

DETERMINACIONES VOLTAMPEROMÉTRICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS  
CEFMINOX E IMIPENEM

Por

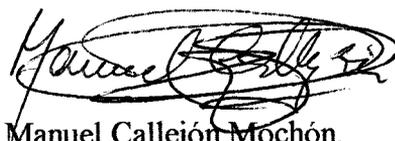
Abdelilah Hilali

El Director



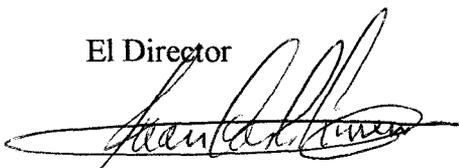
Dr. Miguel Ángel Bello López,  
Profesor Titular del Dpto de  
Química de la Universidad de  
Sevilla.

El Director



Dr. Manuel Callejón Mochón,  
Profesor Titular del Dpto de  
Química de la Universidad de  
Sevilla.

El Director



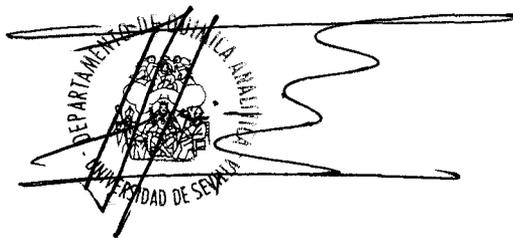
Dr. Juan Carlos Jiménez Sánchez,  
Profesor Titular del Dpto de Química  
de la Universidad de Sevilla.

Memoria presentada para optar el  
grado de Doctor en Ciencias  
Químicas por Abdelilah Hilali.

ALFONSO GUIRAÚM PÉREZ, CATEDRÁTICO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado “**Determinaciones voltamperométricas de los antibióticos cefminox e imipenem**” constituye la memoria de Investigación que presenta Don Abdelilah Hilali para aspirar el grado de Doctor en Ciencias Químicas y que ha sido realizada íntegramente en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección de los Profesores Dr. Bello López, Dr. Callejón Mochón y Dr. Jiménez Sánchez.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado, en Sevilla a 15 de Julio de 2003.



Fdo: Alfonso Guiraúm Pérez

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han participado en la consecución de este trabajo, y especialmente:

- A los Directores de este Trabajo por su constante estímulo, comprensión, paciencia, ayuda y buenos momentos,
- Al Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla D. Alfonso Guiraúm Pérez por haberme permitido realizar este Trabajo, y facilitarme tanto los medios materiales a su disposición como su colaboración personal en todo momento.
- A todo el personal docente y no docente del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, por su amabilidad y ayuda,
- A mis Directores de tesis Miguel Angel Bello, Manuel Callejón y Juan Carlos Jiménez por su gran ayuda y interés que me han dado el animo y la fuerza para realizar esta tesis,
- A los profesores Rosario Escobar Godo y Paco Barragán por su constante preocupación y cariño mostrado en todo momento,
- A Antonio José, Alfonso, Dani, Felix, Juanito, Juanlu, Joaquín y Rut por ofrecerme ayuda cuando fue necesario y compartir conmigo alegrías y buen humor,
- A todos mis compañeros del laboratorio 3, especialmente a Marcos, a las dos Pilares, a Ángela por su ayuda, su amistad, su comprensión, su buen humor,
- A Loli por su apoyo, paciencia y comprensión recibidos en cada momento de alegría y de pena,
- A mis padres y hermanos especialmente mi hermano Driss por creer en mi, ayudarme, apoyarme y animarme durante todo este tiempo,

A mis padres

“Por crear una mente científica y darme apoyo siempre”

A Loli

“Por compartir conmigo esta ilusión”

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

---

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 085 número 51 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 24 de Julio de 2003

El Jefe del Negociado de Tesis



---

INDICE

<b>OBJETO DE LA TESIS</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
1.1. IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE FÁRMACOS.....	7
1.2. CEFALOSPORINAS.....	9
1.2.1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA.....	10
1.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN.....	10
1.2.4. RESISTENCIA BACTERIANA.....	11
1.2.5. FARMACOCINÉTICA.....	11
1.2.6. EFECTOS ADVERSOS.....	12
1.2.6.1. REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ALÉRGICA.....	13
1.2.6.2. NEFROTOXICIDAD.....	13
1.2.7. USO TERAPEÚTICO Y CLASIFICACIÓN.....	13
1.2.8. CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN.....	15
1.2.9. CEFALOSPORINAS DE SEGUNDA GENERACIÓN.....	16
1.2.10. CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN.....	17
1.2.11. CEFALOSPORINAS DE CUARTA GENERACIÓN.....	17
1.2.12. CONCLUSIONES.....	19
1.3. CEFMINOX.....	20
1.3.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	20
1.3.2. DATOS CLÍNICOS.....	21
1.3.2.1. INDICACIONES TERAPEÚTICAS.....	21
1.3.2.2. POSOLOGÍA Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN.....	22
1.3.2.2.1. TRATAMIENTO.....	22
1.3.2.2.2. PROFILAXIS QUIRURGICA.....	22
1.3.2.2.3. CIRURGIA INTRAABDOMINAL.....	23

1.3.2.2.4. INFECCIONES EN LA PIEL Y TEJIDOS BLANDOS.....	23
1.3.2.2.5. INFECCIONES ABDOMINALES.....	24
1.3.2.2.6. INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO.....	25
1.3.2.3. EFICACIA CLÍNICA SEGÚN EL TIPO DE INFECCIÓN.....	26
1.3.2.4. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS Y OTRAS FORMAS DE INTERACCIÓN.....	26
1.3.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	27
1.3.3.1. PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS.....	27
1.3.3.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	28
1.3.3.3. NIVELES EN SUERO.....	28
1.3.3.4. FIJACIÓN A PROTEÍNAS.....	28
1.3.3.5. DISTRIBUCIÓN.....	29
1.3.3.6. METABOLISMO Y ELIMINACIÓN.....	29
1.3.4. PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS.....	29
1.4. CARBAPENEMES.....	31
1.4.1. INTRODUCCIÓN.....	31
1.4.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	31
1.4.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	32
1.5. IMIPENEM.....	34
1.5.1. INTRODUCCIÓN.....	34
1.5.2. PROPIEDADES QUÍMICAS.....	34
1.5.3. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	36
1.5.4. PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS.....	36

<b>II. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN</b> .....	39
2.1. REACTIVOS.....	41
2.2. INSTRUMENTACIÓN.....	42
<b>III. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRAFICO Y DETERMINACIÓN DEL CEFMINOX POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSO (DPP)</b> .....	43
3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	45
3.1.1. INFLUENCIA DEL pH.....	45
3.1.2. TIPOS DE CORRIENTES EN POLAROGRAFIA.....	48
3.1.2.1. CORRIENTE FARADAÍCA.....	48
3.1.2.1.1. CORRIENTE DE DIFUSIÓN.....	49
3.1.2.1.2. CORRIENTE DE MIGRACIÓN.....	50
3.1.2.1.3. CORRIENTES CINÉTICAS.....	50
3.1.2.1.4. CORRIENTES DE DIFUSIÓN CON CONTRIBUCIÓN CINÉTICA.....	52
3.1.2.1.5. CORRIENTES CATALÍTICAS.....	52
3.1.2.1.6. FENÓMENOS Y ONDAS DE ADSORCIÓN.....	52
3.1.2.1.6.1. PREONDAS Y POSONDAS DE ADSORCIÓN.....	52
3.1.2.1.6.2. MÁXIMOS POLAROGRAFICOS.....	53
3.1.2.2. CORRIENTES CAPACITATIVAS.....	54
3.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE PROCESOS ELECTRÓDICOS.....	55
3.1.4. CRITERIOS DE REVERSIBILIDAD DEL PROCESO POLAROGRAFICO.....	56

3.1.4.1. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE POLAROGRAFÍA TAST.....	57
3.1.4.1.1. ANÁLISIS LOGARÍTMICO DE LA FUNCIÓN INTENSIDAD-POTENCIAL.....	57
3.1.4.1.2. DETERMINACIÓN DEL VALOR $E_{3/4}-E_{1/4}$ .....	58
3.1.4.2. ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD MEDIANTE DPP...	59
3.1.4.2.1. CRITERIO DE BIRKE.....	59
3.1.4.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	60
3.1.5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES TRANSFERIDOS EN LA REACCIÓN ELECTRÓDICA.....	62
3.2. ESTUDIO POLAROGRAFICO PREVIO DEL CEFMINOX.....	62
3.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TRITÓN X-100...	63
3.4. INFLUENCIA DEL pH.....	64
3.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEO.....	69
3.6. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE IMPULSO APLICADO.....	71
3.7. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	73
3.8. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO.....	76
3.8.1. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO MEDIANTE POLAROGRAFÍA TAST.....	76
3.8.2. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO MEDIANTE POLAROGRAFÍA DPP.....	79
3.8.3. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO POR VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	81
3.9. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES.....	84

3.10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PROTONES.....	88
3.11. MECANISMO DE REDUCCIÓN DEL CEFMINOX.....	88
3.12. RECTA DE CALIBRADO.....	90
3.13. REPRODUCIBILIDAD.....	92
3.14. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	93
3.15. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CEFMINOX.....	94
3.16. INTERFERENCIAS.....	94
3.17. DETERMINACIÓN DE CEFMINOX EN ORINA.....	95
3.17.1. PROCEDIMIENTO.....	96
3.17.2. DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ORINA DOPADAS.....	96
3.17.3. ANÁLISIS DE CEFMINOX EN MUESTRAS REALES DE ORINA.....	96

#### **IV. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO**

##### **Y DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM**

<b>POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSO.....</b>	<b>99</b>
4.1. ESTABILIDAD DEL IMPENEM EN SOLUCIÓN.....	101
4.2. ESTUDIO POLAROGRÁFICO PREVIO DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM.....	102
4.3. INFLUENCIA DEL pH.....	103
4.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEÓ.....	108
4.5. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE IMPULSO APLICADO.....	110
4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	112
4.7. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO.....	115
4.7.1. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO MEDIANTE POLAROGRAFÍA TAST.....	115

4.7.2. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO MEDIANTE POLAROGRAFÍA DPP.....	118
4.7.3. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO POR VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA.....	120
4.8. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES.....	124
4.9. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PROTONES.....	128
4.10. MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMIPENEM.....	129
4.11. RECTA DE CALIBRADO.....	130
4.12. REPRODUCIBILIDAD.....	132
4.13. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	133
4.14. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMIPENEM.....	134
4.15. DETERMINACIÓN DE IMIPENEM EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS.....	134

## **V. DETERMINACIÓN DE CEFMINOX POR**

### **VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN**

<b>ADSORTIVA CATÓDICA.....</b>	<b>137</b>
5.1. ESTUDIO PREVIO DEL CEFMINOX.....	139
5.2. INFLUENCIA DEL pH.....	140
5.3. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN.....	141
5.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE DEPOSICIÓN.....	143
5.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REPOSO.....	144
5.6. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO.....	145
5.7. RECTA DE CALIBRADO.....	147

5.8. REPETITIVIDAD.....	149
5.9. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	149
5.10. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE CEFMINOX.....	150
5.11. DETERMINACIÓN DE CEFMINOX EN ORINA.....	151
5.11.1. PROCEDIMIENTO.....	151
5.11.2. DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ORINA DOPADAS.....	152
5.11.3. ANÁLISIS DE CEFMINOX EN MUESTRAS REALES DE ORINA.....	153

**VI. DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM  
POR VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN  
ADSORTIVA CATÓDICA.....**

6.1. ESTUDIO PREVIO DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM.....	157
6.2. INFLUENCIA DEL pH.....	158
6.3. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN.....	159
6.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE DEPOSICIÓN.....	160
6.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REPOSO.....	162
6.6. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DEL BARRIDO.....	162
6.7. RECTA DE CALIBRADO.....	165
6.8. REPETITIVIDAD.....	167
6.9. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	167
6.10. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM.....	168
6.11. DETERMINACIÓN DE IMPENEM EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS.....	169

<b>CONCLUSIONES</b> .....	170
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	177
<b>INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	190

## **OBJETO DE LA TESIS**

El objeto de esta Tesis es el estudio electroquímico del cefminox e imipenem. El primero es de la familia de las cefalosporinas, que inhiben la síntesis de la pared de la bacteria actuando sobre las proteínas fijadores de penicilina (PBP<sub>s</sub>), produciendo cambios en la estructura de la célula bacteriana que generan su lisis. El imipenem es altamente activo contra la mayoría de patógenos Gram-positivos, incluyendo *estafilococos*, *neumococos* y *estreptococos*, este último pertenece a los carbapenemes que son una familia de medicamentos antimicrobianos parenterales que se pueden considerar del tipo betalactámico. Este estudio tiene un gran interés dado que estos fármacos han sido desarrollados en los últimos años y existen pocos métodos analíticos que permitan sus determinaciones.

Para alcanzar los objetivos marcados se estableció un plan de trabajo, que puede reunirse en las siguientes etapas:

Recopilación y análisis de los antecedentes bibliográficos sobre los métodos analíticos en la determinación de estos compuestos, sobre las propiedades físico-químicas y propiedades generales, que sirviese de base a la planificación de las etapas posteriores.

Estudio del comportamiento electroquímico de estos fármacos empleando diferentes técnicas voltamperométricas, estableciendo la influencia de las variables que intervienen.

Desarrollo de nuevos procedimientos voltamperométricos, estableciendo las condiciones óptimas de calibración, las interferencias y las posibles aplicaciones.

## **I. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE FÁRMACOS

En el entorno social actual, el medicamento se ha convertido en un elemento que ejerce un impacto muy particular; muchas de las expectativas que se crean a lo largo de la interacción médico-enfermo, se resuelven o transfieren hacia el medicamento, que aparece, así, mitificado. La confianza que parece tener la sociedad en el medicamento es, a todas luces, exagerada e injustificada.

Precisamente porque el medicamento no debe ser una mercancía más de consumo sino un producto capaz de beneficiar o por el contrario de lesionar, debe ser estrictamente regulado por la sociedad a lo largo de sus diversas fases de producción, elaboración y utilización. De ahí la necesidad de controlar el producto, no solo antes de salir al mercado a través de los ensayos clínicos en sus diversas fases, sino una vez que su uso ha sido ya aprobado. Es aquí donde juega un papel importante el análisis de fármacos.

Entre los objetivos del análisis de fármacos está el conocimiento de la interacción de este a nivel molecular, así como las consecuencias de dicha interacción, cuantificando las acciones y efectos farmacológicos en relación con la cantidad de dicho fármaco existente en el sitio donde debe ejercer su efecto, lo que requiere la determinación de las concentraciones del fármaco y sus metabolitos en diversos tejidos y fluidos biológicos.

La enorme actividad biológica de los fármacos entraña un riesgo ineludible: el de la toxicidad. No existe fármaco alguno que no posea cierta toxicidad en mayor o menor grado. La respuesta tóxica a los fármacos varía de unos pacientes a otros en función de las características del fármaco, de la forma en que se administre, de las características del paciente y de su enfermedad y de las

interacciones entre diversos fármacos que se administren simultáneamente. Es indudable la importancia que el análisis de fármacos tiene en este campo, encaminado fundamentalmente al desarrollo de nuevas metodologías que reduzcan considerablemente el tiempo de análisis, así como a la resolución de problemáticas analíticas complejas.

Todos estos objetivos van encaminados a la curación, prevención y diagnóstico ante la aparición de un proceso fisiológico no deseado. Asimismo el análisis juega un papel determinante en el desarrollo de nuevos fármacos y mejora de los ya existentes que permita incrementar la potencia de acción y disminuir efectos secundarios.

Por otro lado, y ante el gran auge que en los últimos tiempos ha tenido el consumo de sustancias que modifican positiva o negativamente las capacidades físicas y psíquicas del consumidor, ya sea humano o animal, se ha desarrollado una extensa legislación que establece los límites legales de consumo. La investigación sobre el análisis de fármacos en este caso va orientada al desarrollo de nuevas metodologías y protocolos para la determinación cuantitativa, rápida y a bajo costo de dichas sustancias incluidas en la legislación.

Existen tres puntos básicos a la hora de abordar el análisis de fármacos. El primero de ellos, es la toma de muestras. Esta debe ser representativa, lo que en ocasiones es complicado cuando se trata de fluidos biológicos; por ello, se hace necesario no solo el desarrollo de las técnicas instrumentales, sino de los protocolos adecuados en la toma de muestras que permitan asegurar que estas son reproducibles al objeto de extrapolar resultados sin cometer errores importantes.

Por otro lado, está la preparación y manipulación de la muestra previamente al análisis del fármaco objeto de estudio. En la mayoría de los casos, el análisis requiere una extracción dicho fármaco de matrices sumamente complejas. La existencia de sustancias o interacciones que causan interferencias durante la preparación producen en ocasiones que el análisis no se realice satisfactoriamente. Asimismo, es de vital importancia establecer claramente el tipo de interferencias que se pueden producir en el protocolo desarrollado para el análisis de un fármaco.

Por último, el tercer punto objeto de estudio es el análisis en si, usualmente mediante procedimientos instrumentales, herramienta fundamental para completar el análisis, puesto que cada problema y cada fármaco en cuestión requiere una metodología determinada. Es este precisamente, el punto en el que se trata de realizar los mayores progresos en orden a reducir el tiempo de análisis, coste, eficacia de acción o personal cualificado requerido en el análisis, entre otros.

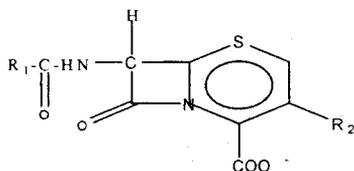
## **1.2. CEFALOSPORINAS**

### **1.2.1. Introducción**

En 1945, Brotzu observó que en las aguas que bañan las costas de Cerdeña había menor concentración bacteriana que en el resto de las aguas que se encontraba examinando. Pensó entonces que podría haber allí alguna sustancia que inhibía el desarrollo de las bacterias. Así, mediante el análisis del agua, llegó a la conclusión de que un hongo llamado *Cephalosporium acremonium* tenía propiedades bactericidas y actuaba impidiendo el desarrollo bacteriano. A partir de este hongo surge la primera cefalosporina, llamada cefalosporina C [1-4].

### 1.2.2. Estructura química

El núcleo activo de las cefalosporinas es el ácido 7-aminocefalosporánico, cuya estructura química es similar al ácido 6-aminopenicilánico. Poseen un anillo betalactámico, y en vez del anillo pentagonal de tizolidona de las penicilinas, tienen un anillo hexagonal de dihidrotiazina. Las cefamicinas son agentes cefalosporinas producidas no por hongos telúricos sino por algunas bacterias de la familia *Streptomyces*, que poseen un grupo metoxilo en posición 7 del anillo betalactámico. Los derivados semisintéticos, se obtienen a partir de sustituciones que se realizan a partir de la cadena lateral del anillo betalactámico. [5]



Estructura química de las cefalosporinas

### 1.2.3. Mecanismo de acción

Las cefalosporinas son antibióticos betalactámicos, de características bactericidas, que tienen un mecanismo de acción común: inhibir la síntesis de la pared de la bacteria. Actuando sobre las proteínas fijadoras de penicilina, se producen cambios en la estructura de la célula bacteriana que generan su lisis.

Estas drogas tienen la particularidad de actuar sobre los microorganismos gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos y *Streptococcus sp.*) [6] y bacilos gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros) [7].

Ninguna de las cefalosporinas tiene acción sobre *Enterococcus sp*, y *Listeria monocytogenes*.

#### **1.2.4. Resistencia bacteriana**

La resistencia bacteriana a las cefalosporinas, es en general, menos frecuente que para las penicilinas. Esta resistencia bacteriana puede estar relacionada con la incapacidad natural o desarrollada por las bacterias, para atravesar la pared bacteriana o los canales (porins) por parte de las cefalosporinas. Puede también ocurrir alteración en la afinidad de las proteínas fijadoras de penicilina o penicilin-binding proteins (PBPs) por las cefalosporinas aunque el mecanismo más importante de la producción de resistencia bacteriana es la elaboración de betalactamasas específicas, éstas enzimas producen la apertura del anillo betalactámico y la pérdida de la actividad antibacteriana [8].

#### **1.2.5. Farmacocinética**

Destacar el aumento de la biodisponibilidad oral de las cefalosporinas esterificadas con los alimentos. El efecto se debe a que los alimentos inhiben las esterasas intraluminales, lo que reduce la tasa de hidrólisis en el estómago. Sin embargo en pacientes pediátricos, la absorción oral de cefpodoxima-proxetil no se modifica por la ingesta.

La insuficiencia renal prolonga la semivida de todos los preparados, por lo que es necesario ajustar la dosis en función del aclaramiento de creatinina, a excepción de la ceftriaxona por su doble eliminación biliar y renal.

Respecto a la penetración tisular, en general las cefalosporinas parenterales de tercera generación penetran en cantidades suficientes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) para ser útiles en el tratamiento de meningitis, sobre todo moxalactam, cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima; suelen hallarse en concentraciones elevadas en líquido sinovial, pericárdico y bilis, y pasan en cantidades apreciables la barrera placentaria. Los estudios referentes a la penetración tisular del resto de los antibióticos de este grupo son escasos. Todos alcanzan concentraciones elevadas en orina (10 veces el nivel sérico). Las concentraciones de cefixima en la bilis son de hasta 30 veces el nivel plasmático, mientras que los niveles en esputo, líquido sinovial y tejido amigdalario no sobrepasan el 25%.

Según su vida media, la administración se realiza cada 6, 8 ó 12 horas. Cefonicid, cefixima y ceftriaxona poseen una vida media de eliminación alta permitiendo su dosificación en una sola toma diaria. Cefotaxima, con una vida media en individuos sanos de aproximadamente 1 hora, es metabolizada a desacetilcefotaxima con una actividad antimicrobiana igual o superior a algunas cefalosporinas de segunda generación y con un aclaramiento más lento. La combinación cefotaxima-desacetilcefotaxima tiene una vida media de eliminación que excede de las 2 horas.

#### **1.2.6. Efectos adversos**

Son antibióticos que causan pocos efectos adversos como ocurre, en general, con los otros betalactámicos. Se utilizan, en la práctica diaria, para el tratamiento de infecciones leves, de manejo ambulatorio, hasta severas que comprometen la vida del paciente [8].

### 1.2.6.1 REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD ALÉRGICA

Entre los posibles efectos adversos incluyen rash cutáneo, urticarias, edema angioneurótico, fiebre, eosinofilia, broncospasmo, y anafilaxia.

Estas reacciones alérgicas son similares a las de las penicilinas, de tal manera que existe hipersensibilidad cruzada entre penicilinas y cefalosporinas, es por eso que en general, las cefalosporinas, no deben usarse en pacientes alérgicos a las penicilinas (salvo reacciones leves). Las cefalosporinas, están especialmente contraindicadas en pacientes que han sufrido reacciones de hipersensibilidad graves a las penicilinas o a otras cefalosporinas [9]

### 1.2.6.2 NEFROTOXICIDAD

Las cefalosporinas, son agentes potencialmente nefrotóxicos. Estos efectos ocurren con altas dosis, y son más factibles de aparecer en pacientes con enfermedad renal preexistente. La combinación con otros agentes como aminoglucósidos, incrementa la incidencia de este efecto adverso, la nefrotoxicidad que consiste principalmente en el desarrollo de necrosis tubular.

### 1.2.7. Uso terapéutico y clasificación

las cefalosporinas se han clasificado basándose en su estructura química, sus características farmacocinéticas y su espectro antimicrobiano. La clasificación en generaciones es la más usada y la más práctica, se basa en la actividad antimicrobiana de estos antibióticos Tabla.1.1 [9].

**Tabla. 1.1** Clasificación de las cefalosporinas

<b>Primera generación</b>	Cefalotina Cefazolina Cefalexima Cefadroxilo Cefradina Cefaloridina
<b>Segunda generación</b>	Cefuroxima Acetil-cefuroxima Cefaclor Cefoxilina Cefprozil Cefotetan Cefonicid Cefminox Cefmetazol Cefamandol
<b>Tercera generación</b>	Sin acción antipseudomonal: Cefotaxima Ceftriaxona Cefixima Cefpodoxima proxetil Ceftibuten Ceftizoxima Con acción antipseudomonal Ceftazidima Cefoperazona
<b>Cuarta generación</b>	Cefepima cefpiroma

### 1.2.8. Cefalosporinas de primera generación

Integran este grupo, drogas que pueden administrarse por vía oral, como la cefalexima, el cefadroxilo y la cefradina, y las que se aplican por vía parenteral como la cefalotina, cefazolina y cefaloridina.

Este grupo de antibióticos tiene acción preferencial sobre los cocos gram-positivos (*Staphylococcus sp*, meticilino sensible y *Streptococcus sp*, sensibles a la penicilina), y algunos bacilos gram negativos (ej: *E. coli*, *K. pneumoniae* y *proteus mirabilis*), sobre todo aquellos causantes de infecciones provenientes de la comunidad [6], y no tienen acción sobre *P. aeruginosa*, *Acinetobacter sp.* y *Staphylococcus sp.* meticilino-resistente.

Tienen escasa acción sobre los anaerobios gram negativos (infradiafragmáticos), pero si actúan sobre los gram positivos que se alojan en la cavidad oral [2].

Tienen buena difusión en todos los tejidos, excepto en la próstata. No atraviesan la barrera hematoencefálica, por lo que no son útiles para el tratamiento de la meningitis. Cuando se administran por vía oral, tienen buena disponibilidad. El 30% de la dosis de cefalotina administrada se metaboliza en el hígado y se elimina por vía renal en forma activa. La cefalexina no se metaboliza y se elimina por vía renal. Deben ajustarse las dosis en los pacientes que padecen insuficiencia renal.

### 1.2.9. Cefalosporinas de segunda generación

Dentro de este grupo encontramos la cefuroxima y la cefoxitina, que se administran por vía parenteral, y la acetil-cefuroxima, cefaclor y cefminox, por vía oral.

Se diferencian de las cefalosporinas de primera generación porque son antibióticos que tienen mayor acción sobre algunos bacilos gram negativos. La cefuroxima tiene acción sobre *H. influenzae b*, incluidas las cepas productoras de betalactamasas. La cefoxitina tiene acción sobre anaerobios gram negativos (*Bacteroides fragilis*).

La cefuroxima es un antibiótico con moderada difusión al líquido cefalorraquídeo (LCR) que puede ser utilizado en el tratamiento de las meningitis, con exclusión de las causadas por *H. influenzae b* y *S. pneumoniae* resistente a la penicilina, debido a que se han registrado casos de fracasos terapéuticos con dicha droga.

La cefoxitina es un antibiótico que puede utilizarse con seguridad y eficacia en las infecciones intraabdominales, ya que tiene también cobertura frente a microorganismos anaerobios [10]. Su metabolismo y la tasa de efectos adversos son semejantes a los de las cefalosporinas de primera generación.

El cefminox es un antibiótico seguro y eficaz en infecciones y profilaxis quirúrgica, en infecciones ginecológicas y en infecciones del tracto urinario.

No se metaboliza en el organismo y es eliminado debido a la filtración renal en forma activa y sin metabolizarse.

### 1.2.10. Cefalosporinas de tercera generación

Dentro de este grupo, se incluyen las de uso parenteral como la cefotaxima, ceftriaxona, y las de uso oral como la cefixima, cefpodoxima y ceftributen. Estas drogas tienen mayor acción sobre los bacilos gram negativos, y además algunas actúan sobre *P. aeruginosa* (cefoperazona y ceftazidima).

Tiene poca acción sobre *estafilococos* y limitada acción antianaeróbica, ya que no cubren *B. Fragilis*. Son antibióticos que alcanzan altas concentraciones en sangre y se difunden muy bien a los tejidos y al líquido cefalorraquídeo.

La ceftriaxona tiene características farmacocinéticas particulares, como su vida media prolongada (8 h) que permite su indicación cada 24 horas, y su uso por vía intramuscular. Su metabolismo es semejante al del resto de las cefalosporinas. La ceftriaxona y la cefoperazona tienen mayor metabolismo hepático. Son estables frente a la acción de las betalactamasas [11].

### 1.2.11. Cefalosporinas de cuarta generación

Dentro de este grupo, la única droga disponible en nuestro medio es la cefepima, que se encuentra en el mercado para su uso en forma parenteral.

Las cefalosporinas de cuarta generación tienen muy buena acción antibacteriana, ya que poseen excelente penetración por la membrana externa de la bacteria, son más estables frente a la acción de las betalactamasas, y tienen gran afinidad de conjugación con las proteínas fijadoras de penicilina de las bacterias.

Su espectro antibacteriano es muy amplio e incluye a las enterobacterias, *P. aeruginosa* y *S. aureus* sensibles a la meticilina. Tienen mejor acción,

demostrada *in vitro*, frente a *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter sp.* comparadas con la ceftazidima. La cobertura de las cefalosporinas de cuarta generación frente a cocos gram-positivos es semejante a la lograda por la ceftriaxona y la cefotaxima, lo que hace a estas drogas útiles para el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos. Han demostrado sinergismo en combinación con otros antibióticos y pueden tener menor capacidad de inducir resistencia bacteriana o de seleccionar organismos con resistencia antibiótica [12].

Por lo tanto, la cefepima resulta más activa frente a los *estafilococos* meticilino-sensibles y algunos bacilos gram negativos como el *Citrobacter freundii* y *Enterobacter sp.*

Al igual que el resto de las cefalosporinas, la cefepima no tiene acción sobre *S. aureus* meticilino resistente, anaerobios, y enterococos. Son drogas para uso parenteral, tienen una excelente penetración tisular, y pueden ser utilizadas cada 12 horas, aún en infecciones severas. Debido a su metabolismo renal, debe ajustarse la dosis en casos de insuficiencia renal [12].

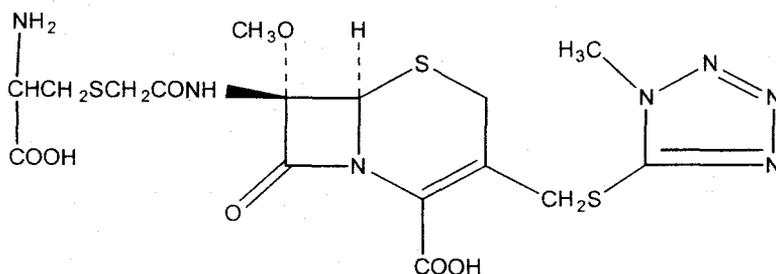
La cefepima administrada por vía intramuscular, tiene una excelente absorción. Se distribuye ampliamente por todos los fluidos y tejidos corporales. La unión a proteínas plasmáticas es del 19%. Alcanza una concentración sérica máxima de 75.1 mg/l. La vida media de esta droga es de 2.26 horas. Se excreta predominantemente por filtración glomerular.

### **1.2.12. Conclusiones**

Las cefalosporinas son un grupo de antibióticos de diverso espectro y numerosas aplicaciones. Muchas de ellas son de primera elección en infecciones graves intrahospitalarias. Otras son alternativas interesantes frente a amoxicilina-ac. clavulánico y quinolonas en las exacerbaciones de la bronquitis crónica, en las infecciones urinarias y en la otitis media-aguda en niños. El uso en el medio extrahospitalario debe ser valorado cuidadosamente por el médico prescriptor, dado su coste y en las pocas ocasiones en las que ofrecen ventajas reales frente a otras alternativas [13].

### 1.3. CEFMINOX

Cefminox es un betalactámico de amplio espectro de acción bactericida, fuertemente activo frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas, tanto aerobias como anaerobias.



Formula del cefminox

#### 1.3.1. Características químicas

7-{2-[(S)-2-amino-2-carboxyethyl]thio-acetamido}-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-ylthiomethyl)-cephem-4-carboxylate. Posee una estructura química que le confiere características muy particulares. Tiene un grupo aminoácido en la cadena lateral (D-Cisteína) que, junto al anillo betalactámico, hace que el cefminox tenga dos puntos de acción sobre la pared bacteriana, que tenga una “Acción Dual”, pues, además de unirse a las clásicas proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), se une al peptidoglicano, inhibiendo la unión con la lipoproteína de la pared bacteriana, aportando unas características farmacocinéticas y farmacodinámicas excelentes.

Además de ser un antibiótico que no está afectado por el Efecto Inóculo, es activo frente a concentraciones decrecientes del fármaco y en la Fase Estacionaria Temprana del crecimiento bacteriano. Es estable frente a betalactamasas por tener un grupo metoxi en posición C-7, lo que hace que el anillo betalactámico sea más estable.

Los niveles alcanzados por cefminox, después de administrar 2 g, son de 117 mcg/ml. Estos niveles superan durante más de 12 h, las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de los gérmenes más habituales, lo que le confiere un amplio margen terapéutico. Cefminox posee una vida media de 2.35 h.

La evaluación clínica del cefminox ha demostrado que es un antibiótico seguro y eficaz en infecciones y profilaxis quirúrgicas, en infecciones ginecológicas y en infecciones del tracto urinario.

### **1.3.2. Datos clínicos**

#### **1.3.2.1. INDICACIONES TERAPÉUTICAS**

- Infecciones del tracto urinario.
- Profilaxis de infecciones post-quirúrgicas en pacientes sometidos a cirugía contaminada o potencialmente contaminada.
- Infecciones del tracto respiratorio: neumonía, absceso pulmonar, bronquitis crónica, bronquiectasias infectadas. Cefminox es inactivo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

## 1.3.2.2. POSOLOGIA Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN

### 1.3.2.2.1. TRATAMIENTO

La dosis e intervalo de las inyecciones se establecen según la gravedad de la infección, estado del paciente y sensibilidad del germen a cefminox. Como pauta habitual se recomienda:

Adultos: 2 g cada 12 horas.

Adultos de bajo peso: 20 mg/Kg cada 12 horas.

En procesos muy graves pueden llegar a administrarse 9 g/día repartidos en tres administraciones.

En pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina 5 ml/min) se ajustará la dosis en función de las características del paciente.

### 1.3.2.2.2. PROFILAXIS QUIRURGICA

Se administrarán 2 g en perfusión continua media hora antes de la intervención. La vía de administración será siempre intravenosa. Para la administración del cefminox en vial con dispositivo especial para venoclisis se añadirán al vial 50 ml de solución fisiológica salina estéril. No debe administrarse por vía intramuscular.

El cefminox puede ser administrado con otros antibióticos si se considerara necesario, siendo su efecto sinérgico cuando se administra con aminoglucósidos [14-17].

### 1.3.2.2.3. CIRURGIA INTRAABDOMINAL

Se evaluó la eficacia y la seguridad del cefminox en el campo quirúrgico. Las altas concentraciones del cefminox alcanzadas en los tejidos abdominales, por encima de las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de los gérmenes más comunes en este tipo de infecciones, en las que predominan gérmenes anaerobios, hacen de este antibiótico un fármaco seguro y eficaz en la cirugía abdominal.

Se realizaron ensayos clínicos en pacientes con infección peritoneal y apendicitis para valorar la eficacia clínica del cefminox y medir los niveles de antibiótico en estos tejidos abdominales. Se administró una dosis preoperatoria y otra en el postoperatorio, durante 11 días como media. Los niveles del cefminox en el pus aislado fueron de 9.63 mcg/ml, incluso 5 horas después de la primera dosis, demostrando que los niveles antibióticos están por encima de las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de los gérmenes patógenos aislados. La eficacia clínica en este tipo de enfermos fue del 85.7%.

Los niveles de cefminox fueron medidos utilizando *Vibrio Percolans* ATCC 8461, demostrando que se mantiene en los tejidos a altas concentraciones durante un largo periodo de tiempo, por encima de las CMI de los gérmenes aislados [16-20].

### 1.3.2.2.4. INFECCIONES EN LA PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

Al administrar cefminox a pacientes con infecciones en piel y tejidos blandos se demuestra su alta eficacia clínica y bacteriológica. Las infecciones causadas por *E. coli*, *Pseudomonas*, *P. vulgaris*, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* y sobre todo por *Bacteroides*

*sp*, tratadas con cefminox presenta una erradiación bacteriológica muy proxima al 100% [19,21].

#### 1.3.2.2.5. INFECCIONES ABDOMINALES

Se ha estudiado el cefminox en diferentes ensayos clínicos en Japón [16-18]. Y estos ensayos demuestran que el cefminox es un antibiótico seguro y eficaz para el tratamiento de infecciones abdominales, incluso en pacientes con infecciones recurrentes tratados anteriormente con otras cefalosporinas.

En un ensayo clínico [19] con 149 enfermos, el cefminox demostró tener una eficacia clínica global del 79%, destacando la eficacia del 83.3% en infecciones hepatobiliares, un 92.1% en peritonitis, un 66.6% en sepsis intraabdominal y un 62.5% en infecciones postoperatorias, matizando que, en todos los casos anteriores, estos pacientes habían sido tratados anteriormente con otros antibióticos, incluso con otras cefalosporinas, no dando ninguna respuesta clínica al tratamiento.

En otro ensayo clínico, [20] en pacientes con infección biliar y también tratados, como en el caso anterior, con otros antibióticos y sin dar respuesta al tratamiento, fueron tratados con cefminox. La eficacia fue del 72.7%, destacando una eficacia clínica del 87.5% y 84.6% en colecistitis y colangitis respectivamente, así como una eficacia bacteriológica frente a gérmenes aislados, del 100% frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* y gram negativos en general.

En un tercer estudio [21] en pacientes con infección abdominal, tratados con cefminox, la eficacia clínica fue de 96.9%, destacando la eficacia de 100% en infección de la vía biliar, en peritonitis difusa y en infecciones de la piel y tejidos blandos.

### 1.3.2.2.6. INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

En varios estudios [17], comparando el cefminox frente a cefotaxima y Latamoxef, se demuestra la alta eficacia clínica y bacteriológica del cefminox. Utilizando las pautas antibióticas recomendadas en cada caso, el cefminox muestra una eficacia igual o incluso mayor (dependiendo del germen causante de la infección) que cefotaxima.

La tabla 1.2 muestra la rapidísima disminución de gérmenes de *E. coli* frente a otros antibióticos. Esta rápida disminución de la piuria viene dada por la alta concentración de cefminox en orina (eliminación del 90% en 24 h) y por los altos niveles alcanzados, muy por encima de las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de los gérmenes más comunes en las infecciones urinarias[22,23].

En estudios comparativos de cefminox con otros antibióticos [17], frente a bacterias de aislados clínicos, muestra un porcentaje de inhibición bacteriana mayor frente a la mayoría de los aislados bacteriológicos, respecto a sus CMI [24-29].

**Tabla 1.2** Rango de disminución en pacientes infectados con *E.coli*.

<b>Rango de disminución en pacientes infectados con <i>E.coli</i></b>		
	<b>RANGO</b>	<b>MEDIA</b>
<b>CEFMINOX</b>	0.00-0.68	0.39-0.29
<b>CEFOTAXIMA</b>	0.52-0.91	0.69-0.16
<b>LATAMOXEF</b>	0.25-0.73	0.47-0.20

### 1.3.2.3. EFICACIA CLÍNICA SEGÚN EL TIPO DE INFECCIÓN

Infección monomicrobiana	{	Cateter no permanente	63%
		Prostatectomizados	
		Itu inferior	100%
		Itu superior	64%
Infección mixta		Cateter no permanente	60%
Pielonefritis aguda			88%
Pielonefritis cronica			100%
Cistitis aguda			83%

### 1.3.2.4. INTERACCIONES CON OTROS MEDICAMENTOS Y OTRAS FORMAS DE INTERACCIÓN

En combinación con diuréticos como la furosemida, debe utilizarse con precaución y controlar la función renal ya que puede aumentar el riesgo de alteración renal.

Pueden presentarse reacciones tipo disulfiram por lo que es desaconsejable la ingestión de alcohol.

Pueden interferir en determinaciones analíticas produciendo falsos positivos en el test de Coombs directo o incrementando aparentemente los niveles de creatinina cuando se determinan por el test de Jaffe.

### 1.3.3. Propiedades farmacológicas

#### 1.3.3.1. PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS

El cefminox es activo a concentraciones fácilmente alcanzables en sangre y demás tejidos orgánicos frente a: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Serratia spp*, *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Campilobacter yeyuni*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae* [29].

Presenta una intensa actividad bactericida frente a *Bacteroides* del grupo *fragilis*, *peptococcus spp*, *Peptostreptococcus spp*, y *Clostridium spp* incluyendo *Clostridium difficile* [15].

Particularmente destacable es su actividad [30] frente a Enterobacterias y bacterias anaerobias estrictas, su potente actividad bactericida, su carencia de efecto inóculo, su estabilidad frente a betalactamasas y su capacidad para inhibir determinadas betalactamasas.

Posee un mecanismo de acción doble, ya que no sólo ejerce su acción antibacteriana inhibiendo la síntesis de la pared celular [31] como otras cefalosporinas, sino que además, inhibe la unión de lipoproteínas y peptidoglicanos de la membrana externa bacteriana a través de su resto D-cisteína. Este segundo mecanismo conduce a la inducción de una rápida lisis de la bacteria. Por ello es capaz de lisar bacterias que se encuentran al comienzo de la fase estacionaria y poblaciones bacterianas densas. Su acción bactericida no se afecta por el tamaño del inóculo e incluso es eficaz bajo condiciones de concentración

decrecientes. Según los parámetros clásicos de susceptibilidad in vitro [32] cefminox se comporta como un antibiótico bactericida.

### 1.3.3.2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

Las propiedades farmacocinéticas del cefminox han sido estudiadas mediante diferentes ensayos clínicos con voluntarios así como en pacientes con diferentes tipos de patología infecciosa.

### 1.3.3.3. NIVELES EN SUERO

El cefminox alcanza una concentración máxima de  $117.32 \pm 18$  mg/l tras la administración de 2 g. El área bajo curva es de  $260.07 \pm 25$  mcg.h/ml y posee una vida media de 2.35 h. Estos valores farmacocinéticos demuestran que alcanza unos valores séricos altos y mantiene su capacidad bactericida después de 12 h, de su administración [33,34].

### 1.3.3.4. FIJACIÓN A PROTEINAS

Al igual que otros antibióticos betalactámicos, penetra en muy escasa cantidad al interior de la célula, siendo la fracción más importante la circulante. Esta fracción circulante se une a proteínas albúmina en un valor medio del 60%. La fracción unida a proteínas es independiente de la dosis administrada con una disponibilidad mantenida a lo largo del tiempo, así como una vida media larga [17,35,36].

### 1.3.3.5. DISTRIBUCIÓN

Los altos niveles alcanzados al administrar 2 g de Cefminox, (117.32 mcg/ml), aseguran una distribución tisular por encima de las CMI de los gérmenes patógenos más frecuentes en la clínica; por ello está dotado de una eficacia clínica y una erradicación bacteriológica excelente. Su penetración tisular es mayor que la de cefoxitina y otras cefalosporinas a las 12 h, de la administración [17,18,37,38].

### 1.3.3.6. METABOLISMO Y ELIMINACIÓN

Después de diferentes estudios con voluntarios sanos y animales, se ha demostrado que no se metaboliza en el organismo y es eliminado debido a la filtración renal en forma activa y sin metabolizarse. La eliminación por vía renal a tan alta concentración (60% a las 6 h, y 85% a las 12 h.) hace del cefminox un antibiótico muy eficaz en las infecciones del tracto urinario [17,18,34,36,38-40].

### 1.3.4. Procedimientos de análisis

Existen tan sólo unos pocos procedimientos desarrollados para el análisis de cefminox en fluidos biológicos y preparaciones farmacéuticas.

En 1998 García González, y R.; Martin-Villacorta [41] proponen un método para la determinación del cefminox en el suero humano y en la orina mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método propuesto requiere un pretratamiento de la muestra utilizando una extracción, una fase móvil de acetonitrilo y una columna de Nucleosil-5 C<sub>18</sub> (15 cm × 4.6 mm i.d.). Utilizan un detector de UV a 272 nm. El rango propuesto de calibración

lineal se encuentra comprendido entre 0.5-100  $\mu\text{g/ml}$  para el suero y 5-500  $\mu\text{g/ml}$  para la orina. El límite de detección obtenido es 0.2  $\mu\text{g/ml}$  y la desviación estándar relativa obtenida esta comprendida entre 1.7-5.8% con una recuperación del 96.5-104%.

En 1999, Wu, Z.J. [42] propone un estudio de la mezcla de 6 cefalosporinas (cefminox, cefadroxil, cefaclor, cefalexin, cefradine y cefoxitin) mediante HPLC. Se usa una columna Hypesil ODC  $\text{C}_{18}$  (20 cm  $\times$  4.6 mm i.d.), el acetonitrilo como fase móvil y un detector de UV a 254 nm. El rango propuesto de calibración lineal se encuentra comprendido entre 0.099-16.4  $\mu\text{g}$  para estas cefalosporinas. En un día y enterdías la desviación estándar relativa obtenida esta comprendida entre 0.4-1.4 y 0.52-1.54% respectivamente, con una recuperación del 97.6-103.5%.

En 2001, Zhu, S. Q. [43] investiga los factores que influyen en el análisis de ocho cefalosporinas, (cefminox, cefoxitin, cefaloridine, cefalexin, cefradine, cefuroxima, cefaclor y cefotaxime) mediante HPLC. El método propuesto, requiere un análisis de correspondencia de estas cefalosporinas.

## 1.4. CARBAPENEMES

### 1.4.1. Introducción

Los carbapenemes son una clase de medicamentos antimicrobianos parenterales que se pueden considerar del tipo betalactámico, pero que difieren de las penicilinas en su composición química, en el que un átomo de carbono ha sido sustituido por un átomo de azufre y existe una adición de un doble enlace en el anillo pentagonal del núcleo de la penicilina. Estos son derivados de la tienamicina, un producto natural de un hongo que reside en el suelo llamado *Streptomyces cattleya* [44].

### 1.4.2. Actividad antibacteriana

Los carbapenemes tienen la actividad más amplia de todos los antibióticos de uso en humanos. El imipenem es altamente activo contra la mayoría de patógenos Gram-positivos, incluyendo *estafilococos*, *neumococos* y *estreptococos*. A diferencia de las cefalosporinas y en similitud a las penicilinas tiene actividad inhibitoria contra listerias, *enterococos* ampicilino-sensibles y *Rhodococcus equi*. Nótese que los *estafilococos* meticilino-resistentes, *enterococos* ampicilino-resistentes y corinebacterias del grupo JK son resistentes al imipenem.

La mayoría de patógenos Gram-negativos son sensibles al imipenem incluso las especies de enterobacterias, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Moraxella* y algunas cepas de *Pseudomonas*. Aunque la frecuencia de resistencia al imipenem entre las enterobacterias y *Pseudomonas* se ha incrementado con el tiempo de uso clínico, este antibiótico se mantiene confiablemente más activo contra estos

patógenos que los antibióticos betalactámicos. Hay bacterias típicamente resistentes al imipenem que son la *Stenotrophomona maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, y el *Flavobacterium*. Aunque la *Legionella* aparece sensible, se considera inapropiado su tratamiento clínico con imipenem por ser ésta un microorganismo intracelular.

En comparación al imipenem, el meropenem es un poco más activo in vitro, por medición de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM 90%), contra los bacilos Gram-negativos aerobios y ligeramente menos activo contra los cocos Gram-positivos aerobios. Sin embargo, las escasas diferencias clínicamente significativas en cuanto a su espectro son la muy disminuida actividad antimicrobiana de meropenem frente a *Enterococcus faecalis* (solo retiene poder bacteriostático), la escasa actividad de imipenem frente a *Clostridium difficile*, y la frecuente actividad bactericida de meropenem frente a *Burkholderia cepacia*, un bacilo nosocomial típicamente resistente al imipenem.

Los carbapenemes son de elección en el tratamiento de las infecciones nosocomiales por *acinetobacter baumannii*, un bacilo gram-negativo emergente en las Unidades de Cuidado intensivo. Los carbapenemes tienen actividades inhibitorias contra *Listeria*, y diversas cepas de *Mycobacterium chelonae*, *fortuitum*, causantes de infecciones dermatológicas crónicas e incluso *M tuberculosis* [45].

### **1.4.3. Propiedades farmacológicas**

Estas son similares a las de las cefalosporinas de tercera generación, que tienen secreción renal y no están altamente ligadas a las proteínas séricas (para el imipenem alrededor de un 20%). La vida sérica media del imipenem es de una

hora, y las dosis entre 500 mg y 1 gramo intravenoso producen picos séricos de 30 a 42 mg/ml y 60 a 72 mg/ml, respectivamente, y los valles séricos a las 6 horas posteriores alcanzan 0.5 a 1.0 mg/ml como mínimo [46].

Tanto imipenem como meropenem tienen un amplio espectro antimicrobiano prácticamente muy parecido. Está por ser demostrada en la práctica clínica la significación que in vitro el meropenem tenga una mayor cobertura para bacilos Gram negativos y una mayor cobertura para cocos Gram positivos en comparación con el imipenem, pero esto no ha sido observado en los ensayos clínicos hasta el momento.

El meropenem no induce convulsiones en una proporción mayor a la de otros antibióticos betalactámicos. El imipenem puede inducir convulsiones en pacientes con insuficiencia renal en los cuales no se ha ajustado adecuadamente la dosis del antibiótico y en pacientes con otros factores predisponentes.

Las indicaciones de los carbapenemes son iguales, exceptuando el tratamiento con meropenem de meningitis por bacterias multiresistentes. Están indicados los carbapenemes en infecciones por *Pseudomonas*, por *enterobacterias* (nosocomiales) multiresistentes, en el tratamiento inicial empírico de la sepsis de origen poco claro, posiblemente en infecciones por *neumococos* intermedicamente resistentes a la penicilina, y especialmente por infecciones polimicrobianas mixtas de microorganismos aerobios y anaerobios, como las que se encuentran intraabdominales o pélvicas.

## 1.5. IMIPENEM

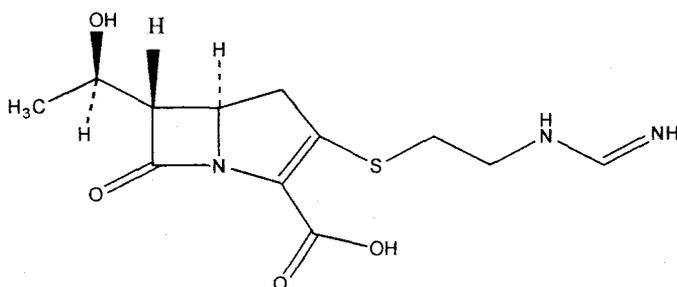
### 1.5.1. Introducción

El imipenem fue el primer compuesto del grupo de los carbapenemes en sintetizarse (semi-sintético). Es hidrolizado en los túbulos renales por acción de dehidropeptidasa, por lo que se coadministra con cilastatina, un inhibidor competitivo de las mismas, a fin de obtener elevados contenidos séricos. El imipenem se administra por vía intravenosa debido a que no se absorbe en el tracto gastrointestinal. Las concentraciones séricas máximas que se alcanzan con este antimicrobiano son 30-33 µg/ml (dosis intravenosa resistente a la acción de betalactamasas y atraviesa la barrera hemato-encefálica).

Se utiliza ampliamente en todo tipo de infecciones tales como las urinarias, respiratorias, bacteriogenecológicas, intraabdominales, óseas y articulares. Este tipo de antimicrobianos puede ocasionar alergia, y los pacientes alérgicos a las penicilinas también pueden presentar alergia al imipenem.

### 1.5.2. Propiedades químicas

El imipenem  $[5R-[5\alpha,6\alpha(R^*)]]-6-(1\text{-hydroxyethyl})-3-[[2-[(\text{iminomethyl})\text{amino}]\text{ethyl}]\text{thio}]-7\text{-oxo-1-azabicyclo}[3.2.0]\text{hept-2-ene-2-carboxylic acid}$  pertenece al grupo de los carbapenémicos, compuestos que tienen una estructura química que difiere del núcleo penem, o núcleo de las penicilinas, porque poseen un átomo de carbono en vez de azufre en la posición 1 del anillo tiazolidina. Además, presentan un enlace no saturado entre los carbonos 2 y 3 de este núcleo [47-49].



Formula del imipenem

Otra propiedad química del imipenem, que influye en su relación estructura-actividad, es aquella que explica parte de su estabilidad a betalactamasas bacteriana. En efecto, la cadena lateral hidroxietílica en configuración trans difiere de los radicales acilamina en configuración cis presentes en el resto de las penicilinas y cefalosporinas [49-51] y es el que protege el anillo betalactámico de la hidrólisis enzimática. Además, el bajo peso molecular del compuesto y su naturaleza zwitteriónica (balance equilibrado entre cargas positivas y negativas) [52,53] permiten explicar en parte la elevada penetración a través de la membrana externa de bacilos Gram-negativos.

Otra propiedad que distingue al imipenem del resto de los antibióticos betalactámicos, es el efecto post antibiótico que ejerce tanto sobre bacterias Gram-positivas (1 a 3 horas) como sobre Gram negativas (2 a 3 horas) [51,54,55].

Antes de su reconstitución, el polvo seco se debe guardar a temperatura inferior a 30°C. Se encuentra descrito que una vez reconstituido, es estable durante al menos 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas bajo refrigeración (4°C). Si se reconstituye con suero salino 0,9% es estable 10 horas a temperatura ambiente y 48 h en refrigerador. No se debe congelar. Las soluciones de

imipenem/cilastatina pueden ser incoloras o tener cierta coloración amarillenta que no afecta a la potencia del producto.

### **1.5.3. Propiedades farmacológicas**

Durante la administración estándar de imipenem de 500 a 1000 mg intravenoso cada 6 horas se han documentado niveles terapéuticos en suero, esputo, tejido pulmonar, muscular, óseo, vísceras abdominales y humor acuoso y vítreo del ojo [56,57].

Los niveles de imipenem en líquido cefalorraquídeo en pacientes con las meninges inflamadas son variables (entre 0.6 y 2.3 mg/ml), aunque no está indicado el uso clínico de imipenem para casos de meningitis por su potencial epiletogénico.

El imipenem se excreta por el riñón. En la ausencia de la cilastatina el 20% del imipenem administrado se recupera sin modificación en la orina, pero en la presencia de cilastatina el 70% se recupera. Es necesario ajustar la dosis administrada en casos de baja filtración glomerular.

### **1.5.4. Procedimientos de análisis**

Se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía la baja estabilidad del imipenem en solución. A fin de estabilizar estas soluciones para su medida se emplean diversos tampones no nucleofílicos tales como MOPS, HEPES, etc con un rango de aplicación alrededor de pH 7.

En 1980, George, Erwin y Schoenewaldt [58] realizan un estudio espectrofotométrico de estabilidad de imipenem en soluciones acuosas. Esta estabilidad se estudia en un rango de temperatura comprendido entre 25 y 40 °C. Dicho método requiere el uso de un tampón no nucleofílico en un rango de pH comprendido entre 5 y 8.

En 1984, Gravallesse, et al [59] proponen un método de determinación de imipenem en plasma y orina mediante HPLC. El método propuesto requiere como fase móvil metanol, una columna Licrosorb C<sub>18</sub> (30 mm/4.6 mm I.D), y detección a 214 nm. El rango de calibración para la orina y el plasma está comprendido entre 0.30 y 72 µg/ml y 1 y 100 µg/ml, respectivamente.

En 1991, Carlucci [60] propone la determinación espectrofotométrica del imipenem y la aplica al análisis en fluidos biológicos. Dicho método utiliza una mezcla de ácido 4-(2-hidroxietilo)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), etilenglicol para estabilizar el imipenem durante varios días. Los límites de detección de imipenem obtenidos por este método son 3 µg/ml para el plasma y 2 µg/ml para la orina. La desviación estándar obtenida es aproximadamente 3% para los rangos de concentración comprendidos entre 2.0-50 µg/ml para el plasma y 2.0-70 µg/ml para la orina. La recuperación del imipenem calculada es de 70% y 76% para el plasma y para la orina, respectivamente.

En 1993, Parra [61] propone un método espectrofotométrico a 300 nm para determinar el imipenem en inyecciones. El límite de detección obtenido es de 0.40 µg/ml, y el rango de calibración está comprendido entre 0.45-0.68 µg/ml. El método propuesto es rápido, simple y no requiere ninguna separación previa.

En 1994, Forsyth e IP [62] proponen un método espectrofotométrico para la determinación de imipenem en Primaxin<sup>®</sup> midiendo a 318 nm. El rango de calibración está comprendido entre 14-42  $\mu\text{g/ml}$  a pH 7 con una recuperación del 100.6%. La desviación estándar relativa de este método es 2%.

En 1997, Garcia-Capdevila [63] propone la determinación de imipenem en plasma mediante HPLC para estudios farmacocinéticos en pacientes a los que se le coadministra cilastatina, que no interfiere. La recta de calibrado en plasma era lineal en el rango 0.1 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los límites de detección y de cuantificación eran 0.030 y 0.08  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

En 1999 Taniguchi [64] propone un método analítico rápido y simple mediante electroforesis capilar. El método propuesto requiere tampón fosfato 100 mM de pH 8, y un capilar de (25  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  47 cm), y detección a 300 nm. El límite de detección para el imipenem es de 176 fmol.

## **II. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN**

## 2.1- REACTIVOS

- Principios activos:

Cefminox sódico

Imipenem

- Disolventes:

Agua desmineralizada (Millipore)

- Reactivos inorgánicos:

Ácido ortofosfórico, hidróxido sódico, cloruro potásico, ácido clorhídrico.

Todos ellos de calidad para análisis y suministrados por (Merk).

- Tampones:

Tampón fosfato 0.1 M de pH 6. Se prepara mediante 1.67 ml de ácido ortofosfórico y sosa 1 M diluyendo con agua hasta un volumen de 250 ml.

Tampón fosfato 0.1 M de pH 2. Se prepara mediante 1.67 ml de ácido ortofosfórico y sosa 1 M diluyendo con agua hasta un volumen de 250 ml.

Tampón fosfato 0.1 M de pH 7. Se prepara mediante 1.67 ml de ácido ortofosfórico y sosa 1 M diluyendo con agua desionizada hasta un volumen de 250 ml.

- Mercurio (Merk).

## 2.2. INSTRUMENTACIÓN

- Potenciostato-galvanostato ECO-Chemie PGSTAT 10-Autolab equipado con un stand polarográfico Metrohm 663 VA y acoplado a un ordenador personal Hyndai 486/100 provisto del software GPES 4.2.

- Electrodo:

Electrodo de trabajo: electrodo capilar de mercurio Metrohm 6.1230.010.

Electrodo de referencia: electrodo de Ag/AgCl/KCl 3 M.

Electrodo auxiliar: electrodo de platino.

- Célula electroquímica Metrohm 6.1415.210.
- Célula electroquímica termoregurable de doble pared Metrohm EA 876-20.
- pH-metro Crison modelo microPH 2002.
- Termostato de circulación de agua Tetron 3000543.
- Baño de ultrasonidos p-Selecta.
- Agitador mecánico Selecta Vibromatic 384.

**III. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO  
POLAROGRÁFICO Y DETERMINACIÓN  
DEL CEFMINOX POR POLAROGRAFÍA  
DIFERENCIAL DE IMPULSO (DPP)**

En este capítulo se realiza un estudio del comportamiento polarográfico del cefminox, llevando a cabo el estudio de la influencia del pH, amplitud de impulso y temperatura sobre la reducción del cefminox. Se determina además la naturaleza del proceso por voltamperometría cíclica, estudio que permite establecer si dicho proceso es reversible o no en las condiciones estudiadas. Se calcula también el número de protones y electrones que intervienen en el proceso de reducción. Estos estudios permiten establecer las condiciones óptimas para la determinación del cefminox, que se aplica al análisis de dicho fármaco en fluidos biológicos.

### **3.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

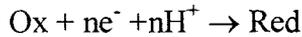
#### **3.1.1. Influencia del pH**

Tanto la forma como la posición y la intensidad de una onda polarográfica o voltamétrica pueden depender en gran medida de la concentración de los protones del medio, por ello la primera variable a estudiar es el pH.

Este estudio permite conocer si los protones intervienen o no directamente en el proceso electroquímico. En cuyo caso, tanto el potencial de onda media ( $E_{1/2}$ ) como el potencial de pico  $E_p$  variarán con el pH. También se pretende poner de manifiesto si la especie electroactiva participa en equilibrios en que los protones intervengan directamente y que hagan variar su concentración, en cuyo caso variarán la intensidad límite ( $I_L$ ) y la intensidad de pico ( $I_p$ ) con el pH.

Los protones participan en la reducción de muchas especies orgánicas. Puesto que la reducción a menudo implica la adición de electrones a una molécula

neutra para formar una especie reducida, que a su vez es una molécula neutra, son necesarios entonces un número igual de protones para asegurar la neutralidad.



Debido a que los protones están presentes, se hace necesario incluir en la ecuación de Nernst la concentración de protones para la reducción.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{\text{ox}} C_{n\text{H}^+}}{C_{\text{red}}}$$

En el caso general, en el que intervienen  $n$  electrones y  $p$  protones, el potencial de onda media quedaría de la siguiente manera:

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} + \frac{RT}{nF} \ln C_{\text{H}^+}$$

Esta ecuación de Nernst solo se aplica en sistemas reversibles, para procesos irreversibles queda modificada añadiendo una constante  $\alpha$  cuyo valor oscila entre 0 y 1.

$$E_{1/2} = E_{\text{const}} - 2.303 \frac{pRT}{\alpha nF} \text{pH}$$

En ambos sistemas se observa la dependencia del potencial con el pH de la disolución. Así, el potencial de onda media para la reducción u oxidación de las especies en la disolución cambia a razón constante por unidad de pH, dependiendo del número de protones y electrones en el paso determinante del potencial. En la reducción el potencial se mueve hacia valores más negativos con

el incremento del pH y en consecuencia el proceso de reducción se vuelve más dificultoso.

Muchas reducciones electroquímicas se realizan en varios pasos. A menudo, el primero de ellos es el determinante en la velocidad e incluso el determinante del potencial. Los siguientes suelen ser rápidos y no afectan al potencial aunque sí a la altura de la onda. La variación del potencial de media onda con el pH es determinada por el número de protones que participan antes en el paso determinante de potencial.

Mediante el estudio del efecto del pH sobre el comportamiento polarográfico de un compuesto se pueden obtener conclusiones sobre la reversibilidad del paso determinante de potencial. La pendiente de la recta del potencial de onda media frente al pH viene dada por  $2.303pRT/\alpha nF$  para procesos irreversibles, donde p y n son el número de protones y electrones que participan en la reacción. Sustituyendo los valores de las constantes universales obtenemos  $0.059 p/n$  V para procesos reversibles y  $0.059 p/\alpha n$  V para procesos irreversibles.

Hasta ahora se ha descrito la variación del potencial con el pH para especies individuales presentes en la disolución. Sin embargo, debido a los cambios en la naturaleza de las especies presentes en la disolución, y a las reacciones ácido/base que tienen lugar, el analito se encuentra en diferentes estados de protonación.

El comportamiento polarográfico de las diferentes formas protonadas de un compuesto individual puede variar considerablemente. A menudo solo una de las formas protonadas es electroactiva; aunque en algunos casos una segunda forma protonada del compuesto resulta ser también electroactiva; aunque la

reducción se produce a un potencial distinto a la primera. En otros casos la forma electroactiva puede ser rápidamente protonada o desprotonada dando lugar a una especie electroactiva en un paso rápido antes del paso electrolítico.

### **3.1.2. Tipos de corrientes en polarografía**

Existen varios tipos de corrientes en polarografía, pero no todas ellas son de interés analítico. La corriente más ampliamente utilizada con fines analíticos es la controlada por un fenómeno de difusión.

Existen diferentes procesos responsables de limitar el crecimiento de la corriente. Esencialmente, la electrólisis puede ocurrir tan rápidamente como la especie electroactiva llega a la superficie del electrodo; por ejemplo, cuando el crecimiento está limitado por la velocidad máxima a la cual el analito llega al electrodo, se habla de corriente límite controlada por difusión. Cuando la velocidad de la reacción química limita la corriente electrolítica, se habla de corriente cinética.

Debido a que algunos tipos de corriente son más útiles o más reproducibles que otros es necesario siempre identificar el tipo de corriente que produce el fenómeno de reducción.

#### **3.1.2.1. CORRIENTE FARADÁICA**

Este término es general para todas las corrientes causadas por la electrólisis de especies químicas en disolución. Recibe este nombre debido a que la electrólisis obedece a la ley de Faraday.

El término es utilizado para diferenciar las corrientes de electrólisis de otras corrientes, tales como la corriente capacitativa, en la que la celda actúa como un componente electrónico. A continuación se exponen los tipos de corrientes faradáicas.

#### 3.1.2.1.1. Corriente de difusión

Es generalmente, la más útil desde el punto de vista analítico. Mientras otros tipos de corrientes, en ocasiones, encuentran aplicación analítica, la corriente de difusión es generalmente la más reproducible.

En un proceso controlado por difusión la corriente límite es controlada por la velocidad a la cual las especies difunden a la superficie del electrodo. Como la electrólisis continúa, la solución en la superficie del electrodo reduce su contenido en especies electroactivas que se deben difundir hacia el electrodo. Esto produciría una caída en el valor de la corriente, pero la gota del electrodo de mercurio crece en área superficial, entrando en contacto con más disolución fresca. Esto, causaría un incremento en la corriente con el tiempo durante la vida de la gota. Estos dos factores opuestos se combinan dando lugar a un sobrecrecimiento en la corriente durante el tiempo de vida de la gota.

Por combinación de estos dos factores. Ilkovic obtuvo la ecuación que lleva su nombre. Para un proceso de reducción catódico:

$$I_d = 708nd^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}Cox$$

En polarografía clásica DC se mide la corriente media durante el tiempo de vida de la gota. Para la corriente media  $I_d$  la ecuación de Ilkovic quedaría:

$$I_d = 607nd^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C_{ox}$$

siendo  $I_d$  la corriente límite de difusión en  $\mu A$ ,  $n$  el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo.  $D_{ox}$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en  $cm^2/segundos$ ,  $m$  es la velocidad de flujo del mercurio en  $mg/segundos$ ,  $t$  es el tiempo de gota en  $s$  y  $C_{ox}$  es la concentración de reactivo en  $mmol/l$ . La única diferencia entre las dos ecuaciones es la constante.

En estas ecuaciones  $n$  y  $D$  son constantes características de la especie electroactiva y  $m$  y  $t$  son parámetros del electrodo que pueden ser tomados como constantes. De esta forma, la corriente límite de difusión es proporcional a la concentración de la especie electroactiva en la disolución. Por tanto, la corriente límite de difusión medida como la altura de la onda puede ser usada como una herramienta analítica para determinar la concentración de las especies.

#### 3.1.2.1.2. Corriente de migración

Esta corriente está causada por la migración de los iones hacia el electrodo. No existe relación lineal con la concentración. Generalmente se suprime la participación de la especie electroactiva en la corriente de migración por la adición de un exceso de un electrolito soporte inactivo, que será el responsable del transporte de la corriente a través de la disolución.

#### 3.1.2.1.3. Corrientes cinéticas

Hay muchos tipos de corrientes cinéticas. En todas ellas la especie electroactiva no se encuentra originariamente presente en la disolución, pero se

forma como producto de una reacción química en la disolución o, en algunos casos, en la superficie del electrodo.

La velocidad de la reacción química es crucial. Una reacción extremadamente lenta mostraría una lenta elevación en la onda convencional controlada por difusión. Sin embargo, si la velocidad de la reacción química es más rápida que la velocidad de difusión, la corriente límite estará controlada por difusión. Para que aparezca una onda cinética, la velocidad de la reacción química debe ser relativamente rápida pero suficientemente más lenta que la velocidad de la difusión.

Para reacciones simples de primer orden, la corriente cinética ( $I_k$ ) viene dada por:

$$I_k = 528 \text{ nm}^{2/3} t^{2/3} D^{1/2} K_f^{1/2} K^{1/2} C_{\text{ox}}$$

Donde  $K_f$  es la constante de la velocidad ( $\text{s}^{-1}$ ) de la reacción química precedente y  $K$  es la constante de equilibrio de la reacción.

La ecuación, expuesta solo es aplicable a reacciones simples de primer orden que preceden a la electrólisis. La expresión puede variar para cinéticas más complejas.

Aunque las corrientes cinéticas presentan relación lineal con la concentración no son útiles para aplicaciones analíticas debido a que estas corrientes son muy sensibles a la temperatura y pH; es difícil obtener suficiente reproducibilidad y exactitud incluso con el mejor control de temperatura disponible.

#### 3.1.2.1.4. Corrientes de difusión con contribución cinética

Este tipo también implica una reacción química que precede al paso electroquímico. En este caso, la velocidad de la reacción química es más similar a la velocidad de la difusión, y el factor limitante en la corriente es una combinación de difusión y de la velocidad de reacción química.

#### 3.1.2.1.5. Corrientes catalíticas

Estas son también cinéticas, pero ahora la reacción química o la electrólisis regenera la sustancia original de la que depende la altura y posición de la onda y, puesto que esta sustancia no es consumida en la electrólisis, actúa como un catalizador, por lo que la onda que genera se conoce como onda catalítica.

Desafortunadamente, aunque las corrientes catalíticas, son a menudo mayores que las de difusión, tienen generalmente una pobre reproducibilidad y por ello tienen un uso muy limitado en química analítica. La corriente de difusión puede también incrementarse mediante un componente catalítico, lo cual es generalmente una molestia y es mejor que este tipo de ondas sean evitadas con fines analíticos.

#### 3.1.2.1.6. Fenómenos y ondas de adsorción

##### 3.1.2.1.6.1. Preondas y postondas de adsorción

Se deben a la tendencia de ciertas sustancias, normalmente orgánicas, a adsorberse sobre la superficie del electrodo.

La principal onda de difusión es acompañada por una onda que la precede o sigue a dicha onda. Esta recibe el nombre en muchos casos de preonda o postonda de Brudicka.

La preonda es causada por la adsorción en la superficie del electrodo de la forma reducida del compuesto electroactivo. Dado que hay sólo un limitado número de lugares disponibles para la adsorción, estos estarán ocupados por encima de una cierta concentración. Así, la altura de esta llegará a ser constante después de una determinada concentración. Las postondas de adsorción son similares pero están causadas por la adsorción de la forma oxidada del compuesto electroactivo.

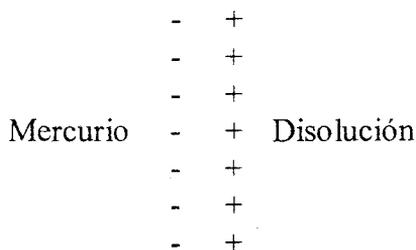
#### 3.1.2.1.6.2. Máximos polarográficos

Hay dos clases de máximos polarográficos. Los de primera clase se encuentran al comenzar la meseta de la onda y son generalmente puntiagudos. Los de segunda clase son montículos redondeados que se encuentran en la meseta de la onda. Ambos son fenómenos de adsorción. Los máximos de primera clase se atribuyen a un flujo rápido de la disolución al electrodo. Los máximos de segunda clase son generalmente observados a concentraciones de electrolito soporte superiores a 0.2 M.

En el análisis polarográfico es necesario a menudo suprimir estos máximos para permitir obtener la medida precisa de la intensidad límite; para tales propósitos puede utilizarse la adición de gelatina o un tensioactivo.

### 3.1.2.2. CORRIENTES CAPACITATIVAS

La corriente capacitativa no es una corriente faradica, es decir, no se debe a una reacción electroquímica, sino a la actuación de la interfase electrodo/disolución como un condensador. Cuando se aplica un potencial negativo al electrodo, la superficie del mercurio queda cargada negativamente; a esta capa de iones negativos se opone otra de iones positivos de la disolución. Estas dos capas de carga (doble capa de Helmholtz) actúan como las dos placas de un condensador.



**Figura 3.1** La doble capa de Helmholtz en la superficie del electrodo

El potencial entre la doble capa de la interfase electrodo/disolución depende directamente de la densidad de carga en la superficie de mercurio. Al imponer un potencial en el electrodo, debe fluir una corriente para crear la doble capa eléctrica que se conoce como corriente capacitativa.

Esta corriente capacitativa no forma generalmente ondas discretas propias, pero si es la mayor causa de corrientes residuales. La corriente capacitativa aumenta cuando lo hace el potencial. Es una señal de fondo, una fuente de ruido, y como tal el mayor factor limitante en la sensibilidad en la polarografía DC.

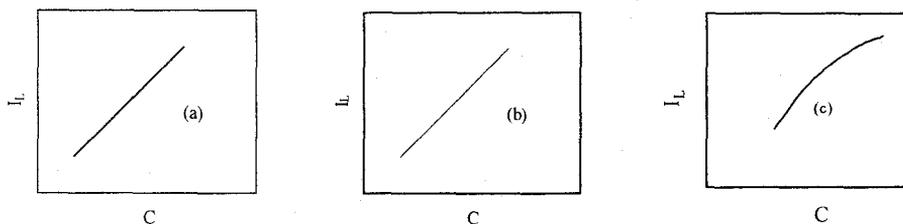
### 3.1.3. Caracterización de los diferentes tipos de procesos electroquímicos

Para distinguir entre los diferentes tipos de procesos electroquímicos se toma como guía la dependencia de la corriente límite con el pH, concentración, temperatura y concentración de sustancia electroactiva polarográficamente[65].

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la corriente límite también es importante para determinar el tipo de corriente que controla un proceso de reducción polarográfica. En general, las corrientes de tipo difusivo presentan un coeficiente de temperatura cuyos valores oscilan entre 1 y 2%, mientras que las corrientes catalíticas y cinéticas muestran valores sustancialmente mayores. Por otra parte, las corrientes de adsorción presentan un comportamiento peculiar, ya que, normalmente, permanecen constantes a medida que aumenta la temperatura hasta alcanzar ésta un cierto valor a partir del cual las ondas tienden a desaparecer paulatinamente, lo que se debe a que los coeficientes de adsorción son inversamente proporcionales a la temperatura.

El estudio de la dependencia del proceso con el pH determina que tipo de corriente controla el proceso electroquímico. Así, cuando la corriente límite es independiente del pH es la difusión o la adsorción la que controla el proceso de reducción, mientras que si es dependiente es una corriente cinética o catalítica la que controla el proceso de reducción.

El tipo de función que relaciona la corriente límite con la concentración de sustancia electroactiva es otro de los criterios que proporciona información sobre la naturaleza de aquella. En la figura 3.2 se muestran los distintos tipos de funciones que se obtienen dependiendo de la naturaleza del proceso electroquímico.



**Figura 3.2** Tipos de dependencia entre la intensidad límite y la concentración de analito en función de la naturaleza del proceso electrodo. a) difusión, b) adsorción, c) cinético

### 3.1.4. Criterios de reversibilidad del proceso polarográfico

Las reacciones electrodo se suelen clasificar, según su velocidad, en reversibles, irreversibles y cuasirreversibles. Las primeras son aquellas en las que el equilibrio termodinámico se alcanza prácticamente de forma instantánea, a cualquier potencial, debido a que la velocidad de transferencia de electrónica es alta. Para estas reacciones las variaciones de la corriente con el potencial reflejan la posición cambiante del equilibrio, que viene descrita por la ecuación de Nernst.

En el otro extremo se encuentran las reacciones totalmente irreversibles, tan lentas que solo se desplazan ligeramente hacia el equilibrio durante la vida de la gota de mercurio. Para estas reacciones, la relación entre la corriente y el potencial viene controlada por la velocidad del proceso de transferencia electrónica y por la forma en que este se encuentra afectado por el potencial del electrodo. Entre estos extremos existe una clase intermedia de reacciones que reciben el nombre de cuasirreversibles.

Existe una gran variedad de criterios para establecer la reversibilidad e irreversibilidad del proceso electroquímico según la técnica que se emplee.

### 3.1.4.1. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS PROCESOS MEDIANTE POLAROGRAFÍA TAST

#### 3.1.4.1.1. ANÁLISIS LOGARÍTMICO DE LA FUNCIÓN INTENSIDAD-POTENCIAL

Se debe tener en cuenta que, para los sistemas más comúnmente estudiados, una onda catódica reversible, a 25°C, está definida por la ecuación:

$$E = E_{1/2} - \left( \frac{0.059}{n} \right) \log \left( \frac{I}{I_l - I} \right)$$

donde E es el potencial aplicado (en V),  $E_{1/2}$  es el potencial de onda media (en V), n es el número de Faraday de electricidad por mol de reactivo, I es la corriente producida para cada potencial aplicado (en  $\mu\text{A}$ ). En consecuencia, la representación de  $-E$  frente a  $\log(I/I_l - I)$ , para un proceso reversible controlado por difusión, a 25°C, debería dar como resultado una recta con una pendiente igual a  $0.059/n$  [66].

La ecuación de una onda polarográfica catódica e irreversible, para un proceso controlado por difusión, a 25 °C, viene dada por la siguiente expresión:

$$E = E_{1/2} - \frac{0.0542}{\alpha n_a} \log \left( \frac{i}{i_l - i} \right)$$

siendo,

$$E_{1/2} = \frac{0.05915}{\alpha n_a} \log \left( \frac{1.349 k_f^\circ \tau^{1/2}}{D^{1/2}} \right)$$

donde  $i$  es la corriente medida al final de la vida de la gota;  $n_a$  es el número de electrones implicados en la etapa controlante de la velocidad del proceso de reducción;  $\tau$  es el tiempo de goteo;  $D$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva;  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia electrónica y  $k_f^\circ$  la constante de velocidad para la reacción electródica a  $E = 0$  en la escala de potencial utilizada.

La representación de  $-E$  frente al  $\log i/i_1 - i$  dará como resultado una recta con una pendiente igual a  $0.0542/\alpha n_a$  y una ordenada en el origen igual a  $E_{1/2}$ . A partir de estos valores obtenidos en el diagrama logarítmico correspondiente, se pueden determinar los parámetros cinéticos  $\alpha n_a$  y  $k_f^\circ$ .

#### 3.1.4.1.2. DETERMINACIÓN DEL VALOR DE $E_{3/4} - E_{1/4}$

El criterio de  $E_{3/4} - E_{1/4}$  se basa en la medida de los valores de  $E_{1/4}$  y  $E_{3/4}$  en los polarogramas registrados por polarografía-tast, siendo estos los potenciales para los cuales la corriente es igual a  $1/4$  y  $3/4$ , respectivamente, de la corriente límite de difusión. Si se aplica la ecuación de Nernst para ambos potenciales a  $25^\circ\text{C}$  se tiene que:

$$E_{3/4} - E_{1/4} = -\frac{0.0564}{n} V$$

por tanto, un proceso electródico reversible debe cumplir esta expresión.

Un proceso irreversible tendrá que cumplir que:

$$|E_{3/4} - E_{1/4}| > \frac{0.059}{n} V$$

### 3.1.4.2. ESTUDIO DE REVERSIBILIDAD MEDIANTE DPP

#### 3.1.4.2.1. CRITERIO DE BIRKE [72]

Se realiza un barrido anódico y otro catódico tomando amplitudes de impulso positivas y negativas, respectivamente. Está basada en la diferencia entre los potenciales catódico y anódico, así como en las diferencias entre las intensidades de pico anódico y catódico.

En resumen, las posibilidades que pueden observarse al aplicar este criterio, así como las conclusiones que pueden deducirse en cada caso son:

-Transferencia de carga reversible

$$E_{pc} - E_{pa} = |\Delta E|$$

-Transferencia de carga cuasireversible

$$E_{pc} - E_{pa} \approx |\Delta E|$$

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} = 1$$

$$\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| < 1$$

para  $\alpha \geq 0.5$

$$\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| > 1$$

para  $\alpha < 0.5$

-Transferencia de carga irreversible

$$E_{pc} - E_{pa} \approx |\Delta E|$$

$$\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| < 1$$

### 3.1.4.3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA

La voltamperometría cíclica permite de manera rápida y sencilla determinar que tipo de mecanismo tiene lugar en la reacción redox, gracias a su capacidad para registrar de forma rápida la evolución del sistema al aplicar una variación de potencial lineal de forma cíclica sobre un electrodo estacionario.

Para un proceso de tipo reversible, la intensidad máxima o  $I_p$ , viene dada por la ecuación de Randles-Sevcik [67,68] confirmada posteriormente por Nicholson [69]:

$$I_p = kn^{2/3}AD_0^{1/2}V_b^{1/2}C_0$$

donde  $k$  es la constante de Randles-Sevcik,  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $A$  el área del electrodo de trabajo,  $D_0$  es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva a dilución infinita,  $V_b$  la velocidad de barrido y  $C_0$  la concentración de la especie electroactiva.

Para procesos irreversibles, la ecuación que proporciona el valor de  $I_p$  incluye el coeficiente de transferencia de carga  $\alpha$ , y fue deducida por Delahay [70].

$$I_p = 2.99 \cdot 10^5 n(n_a \alpha)^{1/2} A D_0^{1/2} V_b^{1/2} C_0$$

donde  $n_a$  es el número de electrones intercambiados en el paso determinante de la velocidad de reacción.

De estas ecuaciones puede deducirse que para procesos reversibles e irreversibles,  $I_p$  es proporcional a la  $V_b^{1/2}$ .

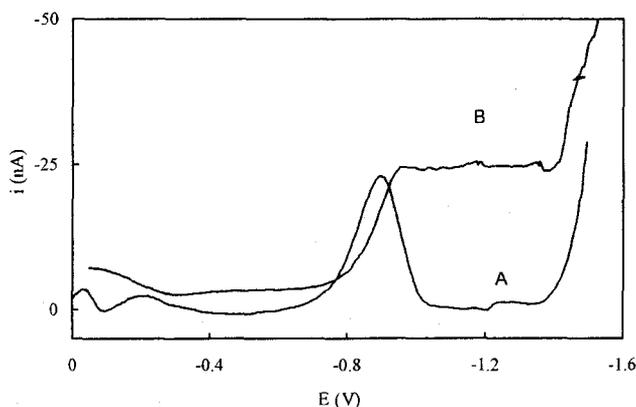
Por otro lado, se ha demostrado que el estudio de la variación del potencial de pico ( $E_p$ ) con  $V_b$  pone de manifiesto el tipo de mecanismo de reducción. Así, para procesos reversibles  $E_p$  no depende de  $V_b$ . Para procesos cuasirreversibles,  $E_p$  se desplaza catódicamente al aumentar  $V_b$ . Por último, para procesos irreversibles,  $E_p$  se desplaza catódicamente  $30/n_a \alpha$  mV cuando  $V_b$  aumenta en un factor de 10 [67-70].

### 3.1.5. Determinación del número de electrones transferidos en la reacción electroquímica

La cronocoulombimetría [71] es una de las técnicas utilizadas para la determinación del número de electrones transferidos en la reacción electroquímica. Este método consiste en medir la cantidad de electricidad necesaria para reducir una cantidad determinada de sustancia en el potencial de la corriente límite, controlado por un potencióstato. Esta técnica es apropiada cuando el número de electrones es igual a 1 o 2, pues a valores superiores aparecen problemas que hacen difícil decidir que número de electrones es transferido.

### 3.2. ESTUDIO POLAROGRAFICO PREVIO DEL CEFMINOX

En una serie de estudios previos sobre el comportamiento polarográfico del cefminox se pudo observar que presenta una onda catódica con potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) alrededor de  $-0.826$  V, como puede verse en la figura 3.3, donde se encuentran representados los polarogramas de polarografía *tast* y polarografía diferencial de impulso (DPP) correspondientes a una muestra conteniendo  $135.4$   $\mu\text{g}$  de cefminox,  $5$  ml de tampón fosfato  $0.1$  M de pH  $6.0$ ,  $0.025$  ml de Tritón X-100 al  $0.015\%$  y agua hasta completar un volumen de  $25$  ml. Una vez preparada la muestra, se trasvasó a la celda polarográfica donde se le pasó una corriente de nitrógeno durante  $10$  minutos, tras lo cual se dispusieron las condiciones necesarias para la medida y registro de los polarogramas por *tast* y DPP. El barrido se realizó desde  $0$  hasta  $-1.5$  V, utilizándose una velocidad de barrido de  $5$   $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de  $-50$  mV, en el caso de DPP.



**Figura 3.3** Reducción del cefminox a pH 6  
 A) Polarografía diferencial de impulso, B)  
 Polarografía tast.

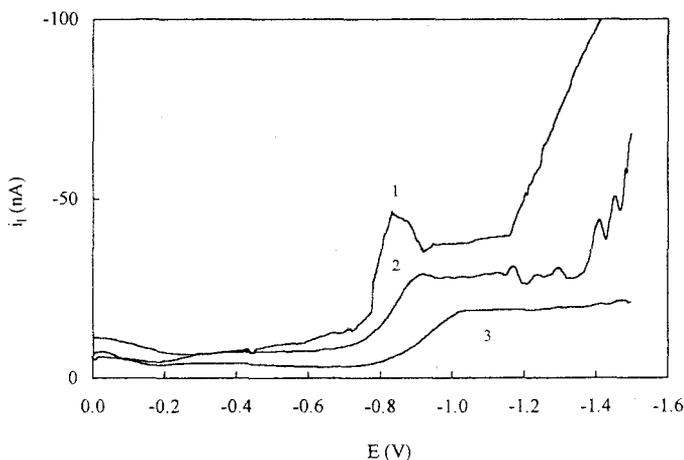
### 3.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TRITÓN X-100

Dado que los estudios previos sobre el comportamiento polarográfico del cefminox muestran una onda que presenta un máximo polarográfico no deseado, se determinó la concentración de tensioactivo necesaria para la desaparición de dicho máximo.

Para ello, se prepararon disoluciones de cefminox de  $10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 6.0 y cantidades del tensioactivo tritón X-100 comprendidas entre 0.01 y 0.05 % (p/v), registrándose los correspondientes polarogramas tast y DPP entre 0 y -1.5 V, utilizando una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de  $-50 \text{ mV}$  en el caso de DPP.

En la figura 3.4 se muestran los polarogramas obtenidos por polarografía tast, para las distintas cantidades de tritón X-100 ensayadas, observándose que para una concentración 0.015 % (p/v) desaparecen los máximos polarográficos sin

que produzca distorsión en las ondas, tal y como se observa a concentraciones de tensioactivo superiores. Por ello se utilizará esta concentración de tensioactivo para todos los estudios posteriores.



**Figura 3.4** Polarogramas tast para distintas concentraciones de tritón-X-100 (p/v). 1) 0.01%, 2) 0.015%, 3) 0.05%

### 3.4. INFLUENCIA DEL pH

Se prepararon disoluciones acuosas  $10^{-5}$  M de cefminox conteniendo además Tritón X-100 en concentraciones 0.015 % (p/v) a diferentes valores de pH, obtenidos con un tampón fosfato de fuerza iónica 0.1 M, registrándose los correspondientes polarogramas tast y DPP entre 0 y -1.5 V, utilizando una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de  $-50 \text{ mV}$  en el caso de DPP.

En las tablas 3.1 y 3.2 se recogen los valores del potencial de onda media y la intensidad límite así como el potencial e intensidad de pico obtenidos a distintos valores de pH para la onda de reducción de cefminox, respectivamente.

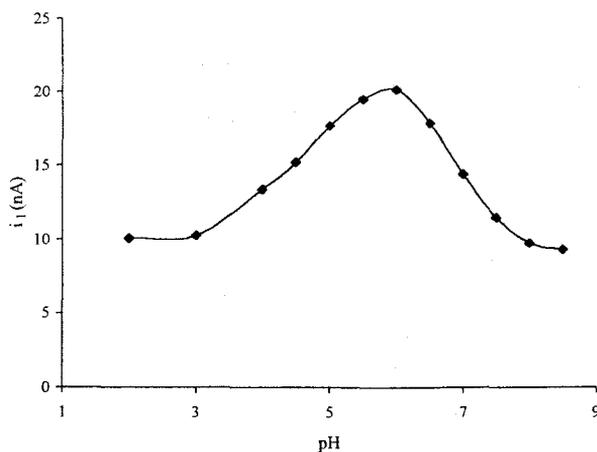
**Tabla 3.1** Efecto del pH sobre  $E_{1/2}$  y  $i_l$  en polarografía tást sobre una disolución de cefminox  $10^{-5}$  M

pH	$-E_{1/2}$ (V)	$-i_l$ (nA)
2.0	0,480	10,080
3.0	0,560	10,255
4.0	0,623	14,399
5.0	0,769	17,645
5,5	0,783	20,020
6.0	0,826	20,048
6,5	0,877	18,200
7.0	0,882	14,400
7,5	0,910	11,500
8.0	0,892	9,760
8,5	0,925	9,300

**Tabla 3.2** Efecto del pH sobre  $E_p$  e  $i_p$  en polarografía diferencial de impulso sobre una disolución de cefminox  $10^{-5}$  M.

pH	$-E_p$ (V)	$-i_p$ (nA)
2.0	0.68	9.2
3.0	0.70	11.9
4.0	0.75	15.4
5.0	0.82	18.5
5.5	0.85	21.3
6.0	0.87	23.2
6.5	0.90	19.5
7.0	0.96	15.7
7.5	0.97	13.5
8.0	0.97	9.0
8.5	0.98	8.5
9.0	1.02	8.3

En las figuras 3.5 y 3.6 se representan las intensidades límite y de pico frente al pH respectivamente. Las intensidades límites y de pico alcanzan sus valores máximos entre 5 y 6.5 decreciendo a pH superiores. A la vista de estos resultados, se escoge un valor de pH de 6 para estudios posteriores, que corresponde al rango de máxima intensidad para la onda.



**Figura 3.5** Variación de la intensidad límite con el pH

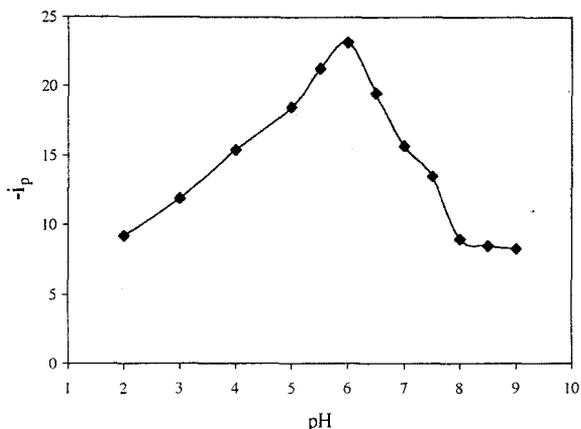
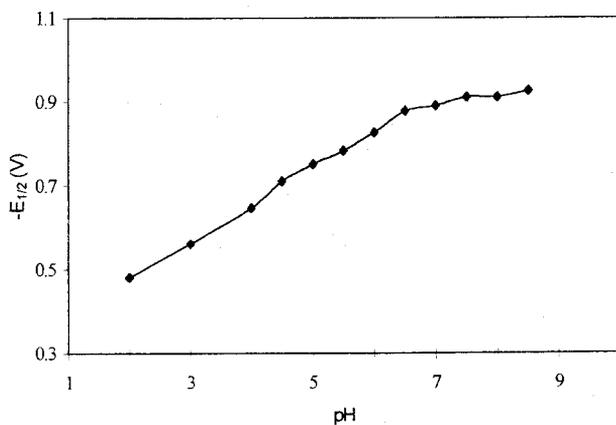


Figura 3.6 Variación de la intensidad de pico con el pH

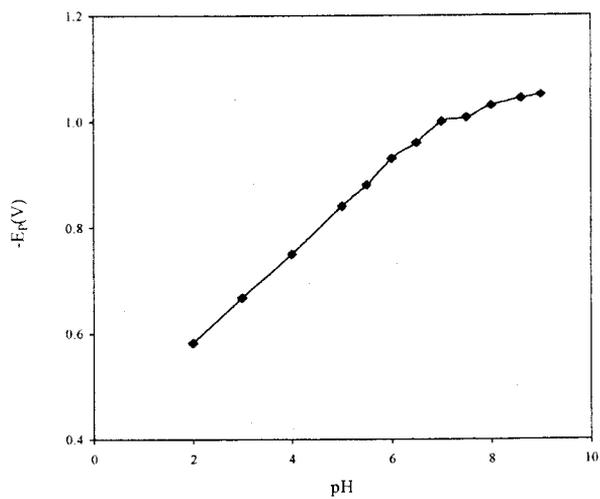
Las representaciones de potencial de onda media y de pico frente al pH aparecen en la figura 3.7 y 3.8 respectivamente. Puede observarse como a medida que el pH aumenta, el potencial de onda media crece hacia valores más negativos. Esta dependencia del pH con el potencial de onda media muestra claramente que los protones participan directamente en los procesos de reducción. Se observa una dependencia lineal entre el potencial de onda media y el pH en los intervalos de pH 2-6.5 y pH 6.5-8.5. Esta dependencia lineal sigue las siguientes ecuaciones:

$$E_p(V) = -0.300 - 0.089 \text{ pH} \quad r = 0.997 \text{ para pH entre 2 y 6.5}$$

$$E_p(V) = -0.728 - 0.023 \text{ pH} \quad r = 0.95 \text{ para pH entre 6.5 y 8.5}$$



**Figura 3.7** Variación del potencial de onda media con el pH



**Figura 3.8** Variación del potencial de pico con el pH

### 3.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEO

Para una altura de depósito prefijada:

$$A = k \cdot t_g^{3/2} \text{ para DPP}$$

donde A es el área de la gota y k engloba el valor numérico 0.85 y a la velocidad de flujo de la altura prefijada. Si se mantiene constante la altura del depósito de mercurio y se registran los polarogramas correspondientes a distintos tiempos de goteo, se obtienen intensidades de pico que son función de los mismos.

Se obtendrá, por tanto, la expresión:

$$i_p = f(t_g^{3/2})$$

donde  $i_p$  aumenta conforme lo hace el tiempo de goteo y varía de forma lineal con  $t_g^{3/2}$ .

El estudio de la influencia de este parámetro se realizó preparando en un matraz de 25 ml una muestra  $10^{-5}$  M de cefminox, 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6.0 y Tritón X-100 al 0.015% (p/v) y agua Milli-Q hasta completar el volumen. La muestra fue trasvasada a la celda polarográfica y se registraron los polarogramas para unos tiempos de goteos comprendidos entre 0.2 y 2 s, fijando la amplitud de impulso en -50 mV.

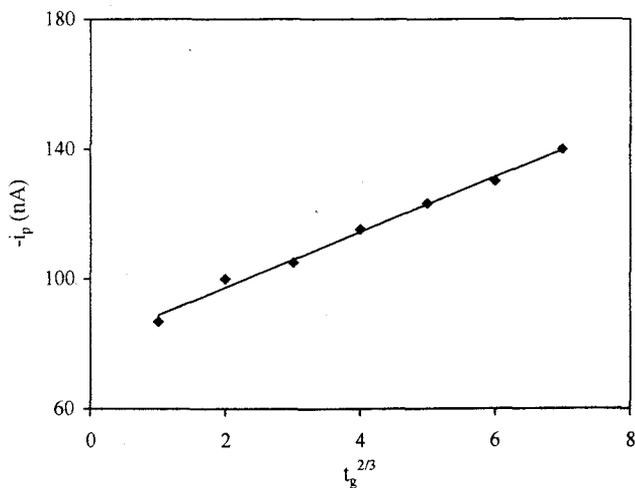
En la tabla 3.3 se muestran los valores obtenidos y se comprueba como la intensidad de pico aumenta al aumentar el tiempo de goteo.

**Tabla 3.3** Variación de los valores de las intensidades de pico con el tiempo en polarografía diferencial de impulso.

$t_g$ (s)	$t_g^{2/3}$	$i_p$ (nA)
0,5	0,63	-105.0
0,7	0,79	-112.0
0,9	0,93	-113.0
1,1	1,07	-110.0
1,3	1,19	-102.0
1,5	1,31	-98.6
1,7	1,45	-89.9

En la figura 3.9 se representa la intensidad de pico frente a  $t_g^{2/3}$ , se observa una dependencia lineal entre las magnitudes representadas. La ecuación que rige esta dependencia es la siguiente:

$$-i_p = 80.43 + 8.46 t_g^{2/3} \quad r = 0.993$$



**Figura 3.9** Variación de la intensidad de pico con  $t_g^{2/3}$

Esta dependencia lineal entre la intensidad de pico y el tiempo de goteo  $t_g^{2/3}$  confirma que el proceso responsable de la reducción del cefminox es principalmente un proceso difusivo. Se fija un tiempo de goteo de 1 s para posteriores experiencias.

### **3.6. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE IMPULSO APLICADO**

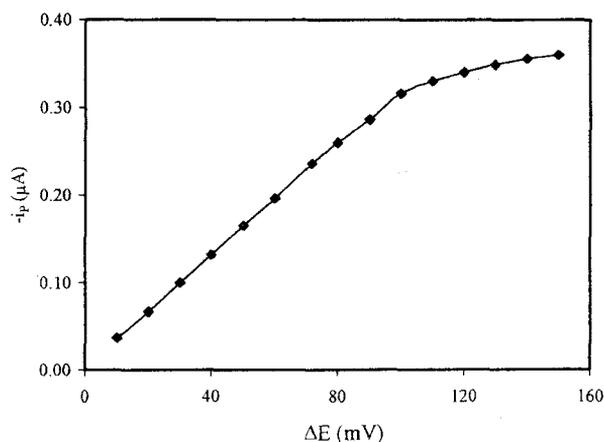
Se sabe que cuanto mayor sea el valor de la amplitud de impulso aplicado mayor es la sensibilidad pero menor es la resolución y a la inversa, por lo que hace imprescindible tomar un valor de amplitud de impulso con el que se alcance una buena sensibilidad sin perder resolución.

Para ello, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones de cefminox de  $10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6 y Tritón X-100 al 0.015% (p/v) y se registraron los polarogramas correspondientes entre 0 y -1.5 V, fijando la velocidad de barrido a  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , variando la amplitud de impulso entre -10 y -150 mV. En la tabla 3.3 aparecen los valores de la intensidad y potencial de pico y los valores de amplitud de impulso. Puede observarse como a medida que aumenta la amplitud de impulso aplicado el valor de potencial de la onda estudiada se va desplazando hacia valores más positivos.

**Tabla 3.4** Variación de la intensidad y potencial de pico con la variación de la amplitud de impulso aplicado.

$-\Delta E(\text{mV})$	$-i_p(\text{nA})$	$-E_p(\text{V})$
10	37	0.680
20	67	0.680
30	100	0.676
40	132	0.672
50	165	0.668
60	196	0.660
70	240	0.648
80	260	0.648
90	286	0.644
100	316	0.636
110	330	0.632
120	330	0.628
130	349	0.625
140	356	0.622
150	360	0.619

En la figura 3.10 se ha representado los valores de la intensidad de pico de onda frente a los valores aplicados de amplitud de impulso. En esta representación se observa la dependencia prácticamente lineal que existe entre la intensidad de pico y la amplitud de impulso en el rango comprendido entre  $-10$  a  $-100$  mV, disminuyendo la intensidad de pico a partir de este valor.



**Figura 3.10** Variación de la intensidad de pico de reducción del cefminox en función de la amplitud de impulso aplicado

Dentro del rango lineal mencionado, se debe tomar un valor de amplitud de impulso que se utilizará en posteriores estudios. Se eligió  $-50$  mV como valor de amplitud de impulso pues no solo proporciona una elevada intensidad de pico sino que además los picos aparecen bien definidos, cosa que no ocurre a valores superiores.

### 3.7. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Se estudió la influencia de la temperatura sobre la corriente límite de la onda polarográfica que presenta el cefminox y la intensidad de pico en el intervalo comprendido entre  $(25 \pm 1)$  y  $(60 \pm 1)$  °C. Como ya se ha mencionado, esto puede servir para deducir el tipo de corriente que controla el proceso de reducción.

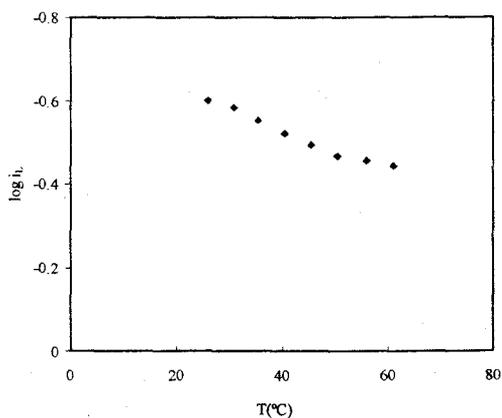
Para ello, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones de cefminox de  $10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6 y Tritón X-100 al 0.015% p/v y agua hasta el enrase. Las muestras así preparadas se llevaron a la

celda polarográfica termostatazada, donde se pasó nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los correspondientes polarogramas mediante las técnicas tast y DPP.

En la tabla 3.5 se recogen los valores de los logaritmos de las intensidades límites y de pico para cada valor de temperatura y en las figuras 3.11 y 3.12 aparecen representados estos datos.

**Tabla 3.5** Variación del logaritmo de la intensidad límite y de pico con la temperatura del cefminox

Temperatura(°C)	Logi <sub>p</sub> (μA)	Logi <sub>l</sub> (μA)
26.0	-0.879	-0.602
31.0	-0.838	-0.585
35,5	-0.809	-0.553
40,5	-0.777	-0.523
45,5	-0.757	-0.495
50,5	-0.740	-0.468
56.0	-0.717	-0.456
61.0	-0.699	-0.444



**Figura 3.11** Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura

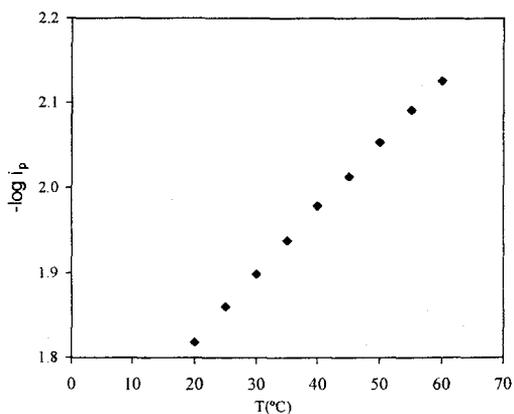


Figura 3.12 Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura

En la tabla 3.6 se recogen los coeficientes de temperatura, calculados mediante la expresión:

$$T_{coe} \% = \left[ \frac{2.303}{T_2 - T_1} \log \frac{i_2}{i_1} \right] \cdot 100$$

y sus valores permiten afirmar que corresponden a un proceso controlado por difusión.

Tabla 3.6 Coeficientes de temperatura de cefminox en polarografía tast y DPP

	TAST	DPP
Coeficiente de temperatura (%)	1.057 ± 0.02	1.18 ± 0.02

### 3.8. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO

En este apartado se ha estudiado la reversibilidad del proceso de reducción del cefminox mediante polarografía *tast*, polarografía diferencial de impulso y voltamperometría cíclica.

#### 3.8.1. Estudio de la naturaleza del proceso mediante polarografía *tast*

Los criterios empleados fueron: el análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y la determinación del valor de  $E_{3/4}-E_{1/4}$ .

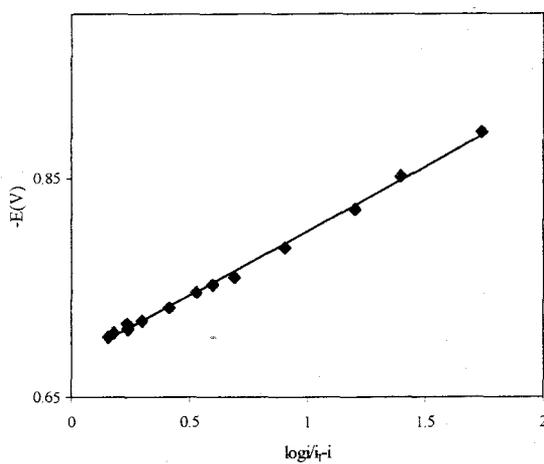
Se registraron polarogramas de disoluciones de cefminox  $10^{-5}$  M a pH 4 y a pH 6 y sobre los resultados se aplicaron los criterios de reversibilidad, tales como el análisis logarítmico de las curvas ( $i, E$ ) y el cálculo de  $E_{3/4}-E_{1/4}$ .

Para la onda de reducción se representó  $-E(V)$  frente al logaritmo de  $i/i_1-i$ , calculando las pendientes en cada caso. El valor de las pendientes obtenidas es igual a  $0.0542/\alpha n_a$ , con lo que, se puede calcular el valor de  $\alpha$  simplemente con saber el número de electrones intercambiados.

En las tablas 3.7 y 3.8 se muestran los valores obtenidos y en las figuras 3.13 y 3.14 las representaciones correspondientes a los pH 4 y 6 respectivamente.

**Tabla 3.7** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial para el cefminox a pH 4.

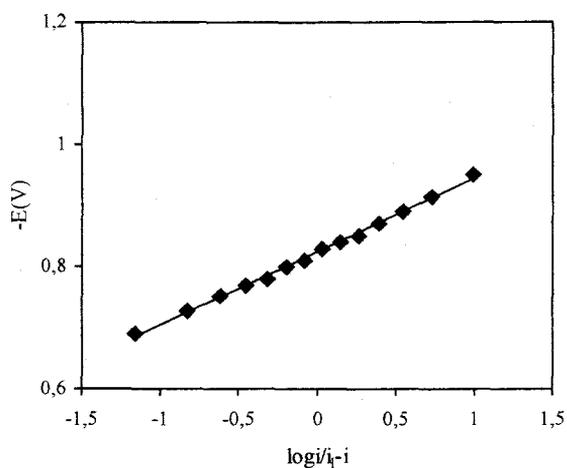
-E(V)	-i (nA) ( $i_l = -38.8$ nA)	Log[i/i <sub>l</sub> -i]
0.49	22.8	0.154
0.51	23.3	0.177
0.53	23.9	0.205
0.55	24.6	0.239
0.57	25.8	0.298
0.60	28	0.414
0.62	29.9	0.526
0.63	31.1	0.606
0.64	32.2	0.688
0.66	34.5	0.904
0.68	36.5	1.2
0.69	37.3	1.396
0.70	38.1	1.736



**Figura 3.13** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 4

**Tabla 3.8** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial para el cefminox a pH 6.

-E(V)	-i (nA) ( $i_p = -20.0$ nA)	Log $[i/i_p - i]$
0.70	1.05	-1.256
0.72	1.54	-1.079
0.74	2.28	-0.890
0.76	3.29	-0.705
0.78	5.02	-0.459
0.80	6.67	-0.300
0.82	9.16	-0.073
0.84	12.20	0.194
0.86	15.50	0.537
0.87	17.20	0.788
0.88	18.50	1.091
0.89	19.50	1.591



**Figura 3.14** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 6.0

En ambas figuras se observa una dependencia lineal entre el potencial y el logaritmo del cociente de intensidades, que siguen las ecuaciones siguientes:

$$\text{pH 4, } E = -0.684 - 0.117\log[i/i_1-i] \quad r = 0.998$$

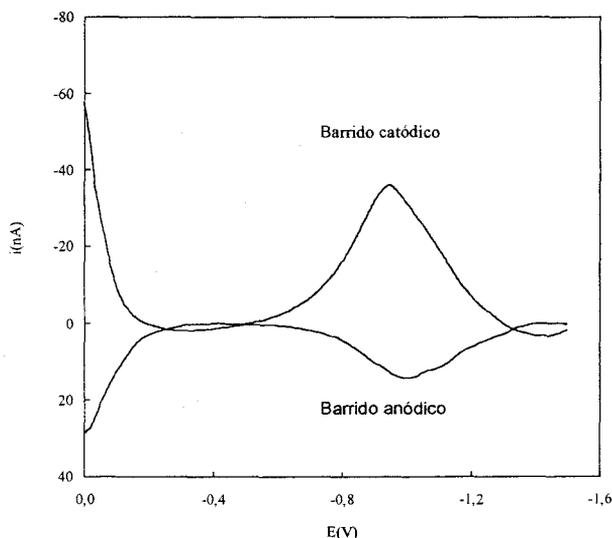
$$\text{pH 6, } E = -0.824 - 0.12\log[i/i_1-i] \quad r = 0.997$$

Las ordenadas en el origen  $-0.684$  V y  $-0.824$  V coinciden con los potenciales de onda media ( $-0.681$  V) y ( $-0.826$  V) respectivamente, y a través de las pendientes  $-0.117$  y  $-0.12$ , se obtiene un valor de  $\alpha n_a$  de 0.47. En el caso que  $n$  sea igual a 2 se obtiene un valor de  $\alpha$  de 0.24, lo que muestra claramente que el proceso que tiene lugar es un proceso irreversible.

Para la determinación del valor de  $E_{3/4}-E_{1/4}$  se ha escogido el polarograma cuyo datos vienen recogidos en la tabla 3.8. Se obtienen valores de  $E_{3/4}-E_{1/4}$  entre 80 y 90 mV por tanto, se puede concluir que el proceso es irreversible.

### **3.8.2. Estudio de la naturaleza del proceso mediante polarografía DPP**

Para llevar a cabo este estudio se ha empleado el Criterio de Birke [72]. En la figura 3.15 se encuentran los polarogramas correspondientes al barrido anódico y catódico (utilizando amplitud de impulso  $+50$  mV para el barrido anódico y  $-50$  mV para el barrido catódico) para una muestra de concentración  $10^{-5}$  M en cefminox y de pH 6.



**Figura 3.15** Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke aplicado a la onda de reducción del cefminox

En la tabla 3.9 se recogen los valores de potencial de pico anódico y catódico, así como las correspondientes intensidades.

**Tabla 3.9** Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke.

Barrido anódico		Barrido catódico	
$I_{pa}$ (nA)	$E_{pa}$ (V)	$I_{pc}$ (nA)	$E_{pc}$ (V)
14.3	-0.993	-38.77	-0.947

El cociente entre la altura del pico anódico y el pico catódico es aproximadamente de 0.37, valor menor que 1 y la diferencia entre el potencial del pico catódico menos el potencial del pico anódico es de 45 mV, aproximadamente igual que la amplitud de impulso. Según estos datos, se puede concluir que el proceso de la reducción es irreversible.

### 3.8.3. Estudio de la naturaleza del proceso por voltamperometría cíclica

Al objeto de conocer si el proceso de reducción del cefminox transcurre de forma reversible o irreversible, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones de cefminox de  $2.5 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 3.0, 6.0, 8.0 y Tritón X-100 en concentraciones 0.15% p/v y agua hasta enrase. Las muestras así preparadas se trasvasaron a una celda polarográfica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos registrándose a continuación los polarogramas mediante voltamperometría cíclica realizando un barrido entre 0 y  $-1.5$  V utilizando una velocidad de barrido de  $500 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

En la figura 3.16 se muestran los voltamogramas obtenidos a distintos valores de pH, confirmándose el carácter irreversible del proceso de reducción de cefminox, ya que, como puede apreciarse en la figura, mediante voltamperometría cíclica se obtiene únicamente la señal de reducción del barrido catódico, sin aparecer la correspondiente señal de oxidación en el barrido anódico.

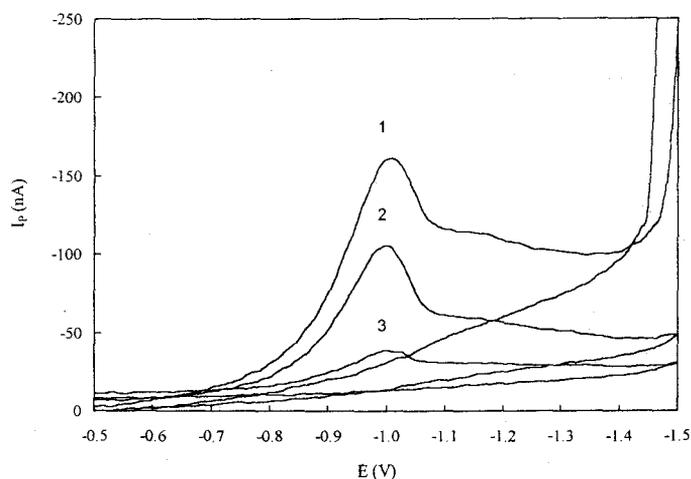


Figura 3.16 Estudio de la reversibilidad mediante voltamperometría cíclica a distintos valores de pH. 1) pH 6; 2) pH 4; 3) pH 8

La dependencia de la intensidad de pico con la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica permite establecer la naturaleza de los procesos electroquímicos. En procesos controlados por difusión, la relación lineal se produce entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y la intensidad de pico.

Para el estudio de la influencia de la velocidad de barrido en los voltamperogramas cíclicos del cefminox se emplean 25 ml de una disolución acuosa de cefminox de concentración  $10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6.0 y Tritón X-100 en concentración 0.015% p/v. Las muestras se trasvasan a una celda polarográfica donde se pasa nitrógeno durante diez minutos registrándose a continuación los polarogramas mediante voltamperometría cíclica realizando un barrido entre 0 y  $-1.5$  V modificando la velocidad de barrido entre 10 y  $1100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En la tabla 3.10 se recogen los valores de intensidad y potencial de pico catódicos obtenidos con cada una de las velocidades de barrido aplicadas para la onda de reducción.

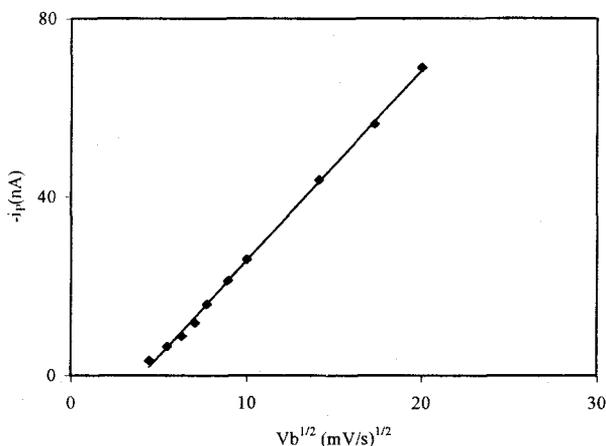


Figura 3.17 Variación de la intensidad de pico con la  $V_b^{1/2}$

**Tabla 3.10** Variación de las intensidades de pico con la variación de la  $V_b$

$V_b$ (mV·s <sup>-1</sup> )	$V_b^{1/2}$ (mV·s <sup>-1</sup> ) <sup>1/2</sup>	$-i_p$ (nA)
10	3.162	2.19
20	4.472	3.45
30	5.477	4.86
40	6.324	6.18
50	7.071	8.96
60	7.746	10.50
80	8.944	13.80
100	10.001	16.71
200	14.142	33.27
300	17.320	48.29
400	20.001	66.19
500	22.360	83.37
600	24.495	98.93
700	26.457	116.50
800	28.284	135.30
900	30.001	145.10
1000	31.623	166.10
1100	33.166	184.40

La representación de la intensidad de pico frente a  $V_b^{1/2}$  se muestra en la figura 3.17.

A la vista de esta representación, que muestra la dependencia lineal entre ambas magnitudes para voltamperograma de reducción, se confirma que el proceso responsable de dicha onda está controlado por la difusión de la sustancia electroactiva hacia el electrodo de trabajo.

La ecuación que rige esta dependencia lineal para la onda de reducción del compuesto objeto de estudio es la siguiente:

$$i_p (nA) = 17.34 - 4.31 V_b^{1/2}, r = 0.999$$

### 3.9. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES

El coeficiente de difusión de una especie electroactiva se puede determinar a partir de las curvas de calibrado obtenidas por polarografía tast, teniendo en cuenta que las corrientes máximas de difusión vienen dadas por la ecuación:

$$i_l = 708 n D^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6} C$$

donde  $i_l$  se mide en amperios,  $n$  es el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo,  $m$  es la velocidad del flujo de mercurio en kg/s,  $\tau$  es el tiempo de gota, controlado electrónicamente, en segundos,  $C$  es la concentración de reactivo en mol/m<sup>3</sup> y el coeficiente 708 agrupa varias constantes. El método consiste en representar la corriente de difusión en función de la concentración de la especie electroactiva, manteniendo constante los demás parámetros. A partir del valor obtenido para la pendiente de la recta,  $P$ , se calcula el valor del coeficiente de difusión,  $D$ , mediante la expresión:

$$D = \left[ \frac{P}{(708 \ n m^{2/3} \tau^{1/6})} \right]^2$$

donde  $m = 4.55 \cdot 10^{-7}$  kg/s y  $\tau = 1$  s.

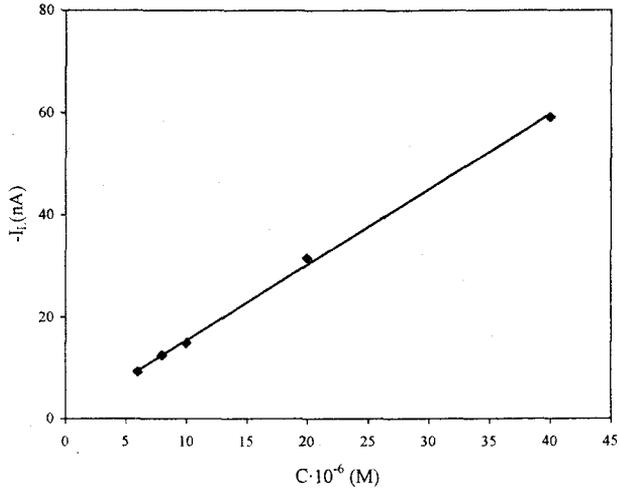
Para el cálculo de dicho coeficiente de difusión se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones de cefminox iguales a  $6 \cdot 10^{-6}$ ,  $8 \cdot 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$  M y Tritón X-100 en concentración 0.015% p/v, conteniendo además 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 3.14 y disoluciones de igual concentración conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6, registrándose los correspondientes polarogramas tast realizando un barrido entre 0 y-1.5 V.

En la tabla 3.11 se exponen los valores de intensidad límite obtenidos para la onda con las distintas concentraciones de cefminox y para los dos valores de pH ensayados.

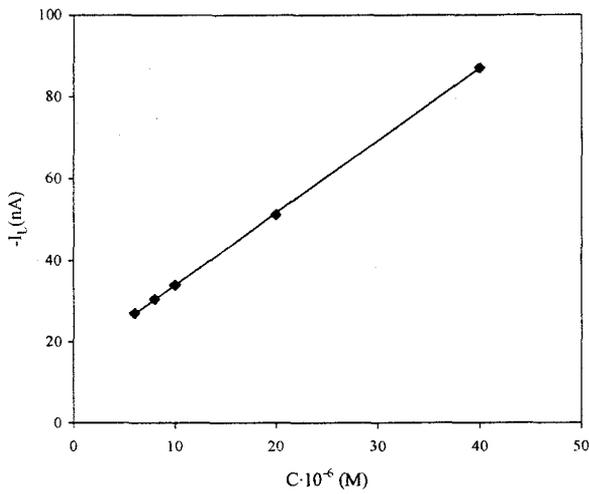
**Tabla 3.11** Variación de intensidad límite con la concentración de cefminox

Concentración (M)	$-i_l(\text{nA})$	
	pH 3.14	pH 6
$6 \cdot 10^{-6}$	9.26	27.07
$8 \cdot 10^{-6}$	12.54	30.48
$10^{-5}$	14.93	33.94
$2 \cdot 10^{-5}$	31.55	51.15
$4 \cdot 10^{-5}$	59.20	87.13

En las figuras 3.18 y 3.19 se representan estos valores, observándose una dependencia lineal entre la intensidad límite de onda y la concentración de cefminox para los dos pH ensayados.



**Figura 3.18** Variación de intensidad límite con la concentración de cefminox pH 3.14



**Figura 3.19** Variación de intensidad límite con la concentración de cefminox pH 6

Sustituyendo los valores de las pendientes de estas rectas en la expresión anterior, se obtienen los resultados recogidos en la tabla 3.12 para el coeficiente de difusión.

**Tabla 3.12** Calculo del coeficiente de difusión de cefminox para pH 3.14 y pH 6

pH	Ecuación de la recta	Coeficiente de difusión ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )
3.14	$i_i = -0.733 - 2.723 C$ , $r = 0.9986$	$1.83 \cdot 10^{-11}$
6	$i_i = -16.266 - 3.263 C$ , $r = 0.9999$	$2.63 \cdot 10^{-11}$

Una vez calculados los potenciales iniciales y finales y el coeficiente de difusión, se realiza la cronoculombimetría para cada una de las concentraciones utilizadas en el cálculo del coeficiente de difusión, aplicando estos potenciales. Los valores de  $Q$  y  $t^{1/2}$  obtenidos son representados con el fin de calcular el número de electrones a través de la pendiente de dicha gráfica que coincide con la expresión  $2nFAD^{1/2}C_{ox}^*/\pi^{1/2}$ , donde  $C_{ox}^*$  es la concentración de la especie electroactiva fuera de la capa de difusión. Sustituyendo en esta ecuación y despejando  $n$  obtendríamos el número de electrones que participan en el proceso de reducción del cefminox. En la tabla 3.13 se muestran los valores calculados para el número de electrones  $n$  para cada concentración de cefminox y para los valores de pH 3.14 y 6.

**Tabla 3.13** Calculo del número de electrones mediante cronoculombimetría a pH 3.14 y pH 6

Concentración (M)	Número de electrones	
	pH 3.14	pH 6.0
$6 \cdot 10^{-6}$	2.44	2.09
$8 \cdot 10^{-6}$	2.41	2.21
$10^{-5}$	2.07	2.05
$2 \cdot 10^{-5}$	1.84	1.86
$4 \cdot 10^{-5}$	1.95	2.02
nº medio electrones	$2.14 \pm 0.21$	$2.046 \pm 0.25$

### 3.10. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PROTONES

Al objeto de conocer el mecanismo de reducción del cefminox, es necesario calcular el número de protones,  $p$ , que intervienen en el proceso, que se calculan a partir del parámetro  $\alpha n$ , obtenido mediante el análisis logarítmico de la función intensidad-potencial.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras de cefminox, de concentración  $10^{-5}$  M y Tritón X-100 en concentración 0.015% p/v, variando el valor de pH entre 3 y 6. Las muestras así preparadas fueron trasvasadas a una celda polarográfica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos registrándose los correspondientes polarogramas entre 0 y  $-1.5$  V usando la técnica polarográfica *tast*. El valor de  $\alpha n_a$  para el rango de pH estudiado es  $0.47 \pm 0.01$ .

Una vez conocido el valor del parámetro  $\alpha n_a$  se calcula el número de protones que participan en el proceso de reducción del cefminox a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta pH} = \frac{0.059 p}{\alpha n}$$

Se obtiene un valor de  $p$  (nº de protones) de  $1.08 \pm 0.1$ .

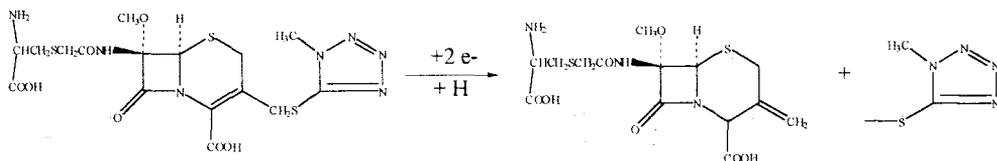
### 3.11. MECANISMO DE REDUCCIÓN DEL CEFMINOX

El proceso de reducción de cefminox consume dos electrones y un protón y presenta una onda polarográfica a un potencial de onda media  $-0.826$  V. Dada su similitud estructural con el cefmetazole, cefazolina, cefmandole, cefmandole

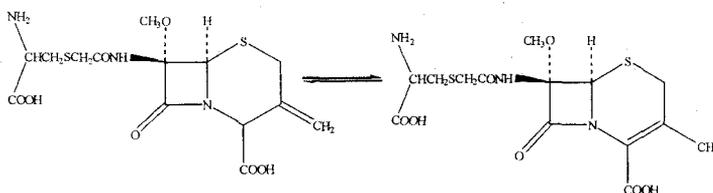
nafate, cefalotina y cefacetrilo [73-75], que tienen un grupo saliente como sustituyente en la posición C<sub>3</sub> y un sustituyente no electroactivo en la posición C<sub>7</sub>. En todos estos casos, los polarogramas DPP presentan un potencial alrededor de -1.0 V en el rango de pH comprendido entre 2.0-6.0, que corresponde a un comportamiento en todo análogo al del cefminox. El proceso de reducción tiene lugar a un intercambio de dos electrones y con la eliminación del sustituyente en posición orto [76,77].

A partir de los resultados obtenidos y, de acuerdo con los mecanismos propuestos por otros autores se propone el siguiente mecanismo en dos etapas:

Una primera etapa en la que intervienen dos electrones y un protón y en la que tiene lugar la ruptura de la molécula y que produce la onda de reducción a un potencial de -1.0 V.



Una segunda etapa en la que no interviene ni electrones ni protones y que tendría lugar a un equilibrio totomérico,



### 3.12. RECTA DE CALIBRADO

Se ha estudiado mediante polarografía diferencial de impulso la influencia de la concentración de cefminox siguiendo la variación que se produce en las intensidades de pico. La  $i_p$  viene dada por la ecuación:

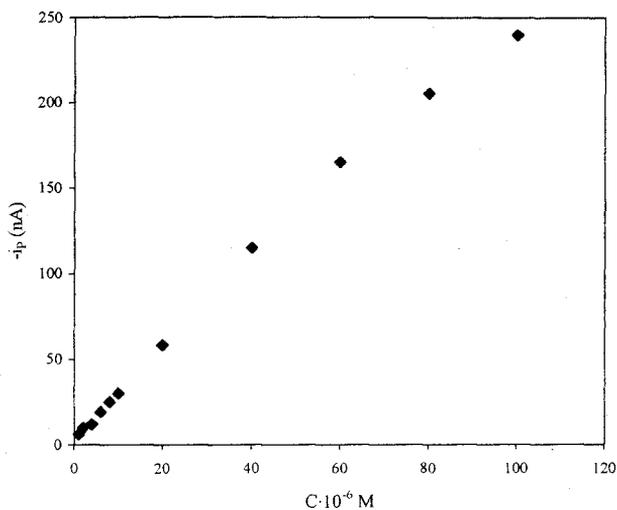
$$i_p = nFAC_{ox} \sqrt{\frac{D}{\pi t_r} \frac{\sigma - 1}{\sigma + 1}}$$

donde  $\sigma = e^{\frac{nF \Delta E}{RT}}$ , siendo  $\Delta E$  la amplitud de impulso. El máximo valor que puede tomar  $(\sigma - 1)/(\sigma + 1)$  obtenido para altas amplitudes de impulso es la unidad, y la expresión se transforma en la ecuación de Cottrell, obteniéndose una onda y no un pico.

Si mantenemos constantes todos los parámetros excepto la concentración de especie electroactiva tendremos que para una onda de difusión,  $i_p$  es una función de la concentración.

Para comprobar esta relación, se preparan muestras, en matraces de 25 ml conteniendo cefminox de distintas concentraciones entre  $5.8 \cdot 10^{-6}$  y  $6 \cdot 10^{-5}$  M, Tritón X-100 en concentraciones 0.015% p/v, 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6.0 y agua hasta enrase. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda polarográfica donde se desoxigenan pasando nitrógeno durante 10 minutos, registrándose los correspondientes polarogramas entre 0 y  $-1.5$  V, fijando una  $V_b$   $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  y  $\Delta E$  en  $-50$  mV.

En la figura 3.19 se muestra la relación existente entre la concentración de cefminox y la intensidad de pico.



**Figura 3.19** Variación de la intensidad de pico con la concentración de cefminox

En el rango de concentraciones estudiado existe una relación lineal entre la concentración y la intensidad de pico entre  $2 \cdot 10^{-6}$  y  $6 \cdot 10^{-5}$  M, por lo que el calibrado se realiza para este rango de concentraciones.

En la figura 3.20 se muestra la recta de calibrado obtenida a partir de triplicados preparados y medidos de la misma forma que en el párrafo superior. la expresión de la ecuación obtenida tras el ajuste por mínimos cuadrados, es la siguiente:

$$-\Delta i_{max} = (3.1 \pm 0.7) + (2.73 \pm 0.03)C, r = 0.9996$$

donde  $-\Delta i_{max}$  es en nA y C en  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

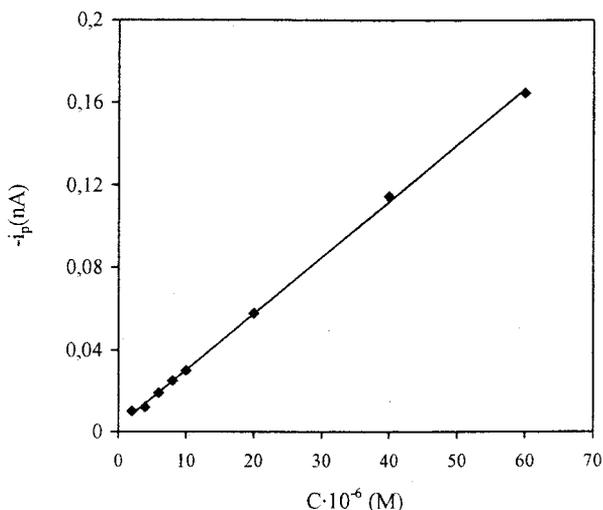


Figura 3.20 recta de calibrado del cefminox

### 3.13. REPRODUCIBILIDAD

Para conocer la reproducibilidad del método propuesto se prepararon dos series de 9 muestras iguales en matraces de 25 ml conteniendo  $10^{-5}$  y  $5 \cdot 10^{-5}$  M de cefminox, 5 ml de tampón fosfato de pH 6 y Tritón X-100 en concentración de 0.015% (p/v), registrándose los correspondientes polarogramas como en apartados anteriores y obteniéndose los valores de intensidad de pico pertenecientes a cada una de las ondas de reducción. Los parámetros estadísticos, valor medio de la señal ( $y_m$ ); desviación estándar ( $s$ ); y desviación estándar relativa (%E) se recogen en la tabla 3.14, y fueron calculados de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$y_m = \sum_{i=1}^n y_i$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_m)^2}{n-1}}$$

$$\%E = \frac{s}{y_m} \cdot 100$$

**Tabla 3.14** Reproducibilidad. Cálculo de parámetros estadísticos

	Concentración $10^{-5}$ (M)	Concentración $5 \cdot 10^{-5}$ (M)
$y_m$ (nA)	16.94	130.89
s (nA)	0.63	4.32
%E	3.7	3.3

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que la precisión del método es similar tanto a altas como a bajas concentraciones.

### 3.14. LIMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se calculó el límite de detección ( $X_{LOD}$ ) y el límite de cuantificación ( $X_{LOQ}$ ) a partir de la ecuación de la recta de calibrado obtenida en el apartado 3.12. Los valores de intensidad de pico correspondientes al límite de detección ( $y_{LOD}$ ) y cuantificación ( $y_{LOQ}$ ) se calculan a partir del valor de la desviación estándar de la señal del blanco, que viene dada por la siguiente expresión:

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

donde  $y_i$  son los valores de la intensidad de pico obtenidos para cada concentración,  $\hat{y}_i$  son los valores de intensidad de pico calculados a partir de la recta de regresión y  $n$  es el tamaño muestral [78].

$$y_{\text{LOD}} = a + 3 S_B$$

$$x_{\text{LOD}} = (y_{\text{LOD}} - a)/b$$

$$y_{\text{LOQ}} = a + 10$$

$$x_{\text{LOQ}} = (y_{\text{LOQ}} - a)/b$$

donde  $a$  es la ordenada en el origen y  $b$  la pendiente de la recta de calibrado. Con estos datos se obtiene un límite de detección de  $0.95 \text{ mg.l}^{-1}$  y un límite de cuantificación de  $3.14 \text{ mg.l}^{-1}$ .

### **3.15. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DEL CEFMINOX**

En un matraz de 25 ml se pone una cantidad de cefminox comprendida entre  $78.5\text{-}812.4 \mu\text{g}$ , se añaden 5 ml de tampón fosfato de pH 6, Tritón X-100 en concentración 0.015% (p/v) y se enrasa con agua desionizada. Las muestras se colocan en una celda polarográfica, registrándose los correspondientes polarogramas, entre 0 y  $-1.5 \text{ V}$  después de desoxigenar durante diez minutos con una corriente de nitrógeno puro, frente a electrodo capilar de mercurio mediante la técnica de polarografía diferencial de impulso. Los polarogramas se registran fijando una amplitud de impulso de  $-50 \text{ mV}$  y una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Por comparación con la correspondiente recta de calibrado, obtenida en iguales condiciones se determina la concentración de cefminox.

### **3.16. INTERFERENCIAS**

Dado que el cefminox está siempre asociado con otros antibióticos (penicilinas, aminoglucidos, ect) para su administración a personas enfermas que sufren serias infecciones. De acuerdo con lo anterior se ha estudiado la interferencia de varios antibióticos en la determinación de  $10^{-5} \text{ M}$  de cefminox.

Para ello se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de cefminox de concentración  $10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6, Tritón X-100 en concentración 0.015% p/v y cantidades variables de estos antibióticos hasta que no interfiera, registrándose los correspondientes polarogramas usando la técnica de diferencial de impulso, fijando la amplitud de impulso en  $-50$  mV y la velocidad de barrido en  $5$  mV·s<sup>-1</sup>. Se considera que hay interferencia cuando se produce una desviación del  $\pm 5\%$  en comparación con los resultados obtenidos en ausencia de la especie interferente.

En la tabla 3.15 se muestran los resultados obtenidos, de los que se puede concluir que; en general, se puede determinar el cefminox satisfactoriamente en la presencia de otros antibióticos.

**Tabla 3.15** Influencia de antibióticos sobre la determinación de cefminox

Compuestos que interfieren	Límite de interferencia (p/p)
Amikacina, sulbactam, dypirona	500:1
Gentamicina,	250:1
Penicilina	100:1
Ceftazidina	100:1
Cefazolina	5:1
Cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol	1:1

### 3.17. DETERMINACIÓN DE CEFMINOX EN ORINA

Dado que aproximadamente el 80% del cefminox suministrado se excreta inalterado en la orina, se procedió a aplicar el método propuesto a su determinación en este fluido.

### **3.17.1. Procedimiento.**

Se toma una alícuota de 5 ml de orina y se diluye con agua Milli-Q hasta 25 ml en un matraz aforado. Se toman 5 ml de esta disolución, se añaden 5 ml de tampón de fosfato de pH 6 y se diluye con agua hasta 25 ml en un matraz aforado. Se registran los polarogramas de la disolución así obtenida de acuerdo con el procedimiento previamente descrito para la determinación de cefminox por DPP. Los polarogramas correspondientes a muestras preparadas de esta forma pero que no contienen cefminox no muestran señal que pudiese interferir en la determinación.

### **3.17.2. Determinación en muestras de orina dopadas.**

Se procedió a la determinación de cefminox en muestras sintéticas, preparadas dopando un “pull” de orinas con 1000 mg.l<sup>-1</sup> y 2500 mg.l<sup>-1</sup>, de acuerdo con el procedimiento descrito, y se obtuvieron los resultados que aparecen en la tabla 3.16, que muestran excelentes recuperaciones.

Se estudió, asimismo, la precisión interdías para muestras preparadas de la misma forma, en 5 días distintos, obteniéndose unos valores de 1010 ± 9 y 2508 ± 12 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente.

### **3.17.3. Análisis de cefminox en muestras reales de orina.**

Se administró una dosis de 2 g de TENCEF<sup>®</sup> (cefminox) a dos voluntarios, se recogieron muestras de orina a diferentes intervalos de tiempo y se procedió a la determinación de cefminox de acuerdo con el procedimiento previamente descrito. Debido a que el volumen de orina es variable, los resultados obtenidos se

expresaron respecto a un volumen “normalizado” de 200 ml, a fin de comparar las cantidades excretadas por autores voluntarios.

**Tabla 3.16** Análisis de muestras de orina dopadas con cefminox mediante DPP.

Concentración añadida (mg.l <sup>-1</sup> )	Concentración calculada* (mg.l <sup>-1</sup> )
1000	995 ± 8
2500	2505 ± 10

(\*)Media ± S para 5 determinaciones.

Las muestras fueron también medidas, tras un procedimiento de extracción, mediante un procedimiento cromatográfico [41] empleando una columna Nucleosil C18 de 5 µm de diámetro de partícula y 150 mm de longitud, una mezcla 97:3 de tampón de fosfato de pH 6 y acetonitrilo como fase móvil y detección fotométrico a 272 nm.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3.17, y se observa una muy buena concordancia entre los resultados obtenidos por DPP y las correspondientes determinaciones mediante HPLC, contrastada estadísticamente mediante la aplicación del ensayo t para comparar dos medias experimentales y el ensayo F de dos colas para la comparación de la precisión.

Los porcentajes de cefminox excretadas son plenamente comparables a los obtenidos por otros autores [34,36,79].

**Tabla 3.17** Análisis por DPP de muestras reales de orina tras la administración de 2 g de cefminox.

Tiempo (h)	DPP			HPLC
	Contenido <sup>a</sup> (mg·l <sup>-1</sup> )	F <sub>test</sub>	t <sub>test</sub>	Contenido <sup>a</sup> (mg·l <sup>-1</sup> )
1	25.08 ± 23	2.35	0.25	2512 ± 15
	2460 ± 28	4.64	1.40	2485 ± 13
3	3480 ± 35	8.51	1.17	3505 ± 12
	3535 ± 21	5.44	1.14	3520 ± 9
5	1572 ± 25	1.92	0.34	1566 ± 18
	1438 ± 30	14.06	0.78	1452 ± 8
12	935 ± 19	2.98	1.26	951 ± 11
	780 ± 7	5.44	0.68	783 ± 3
		39.00 <sup>b</sup>	2.78 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>Media de tres determinaciones ± desviación estándar

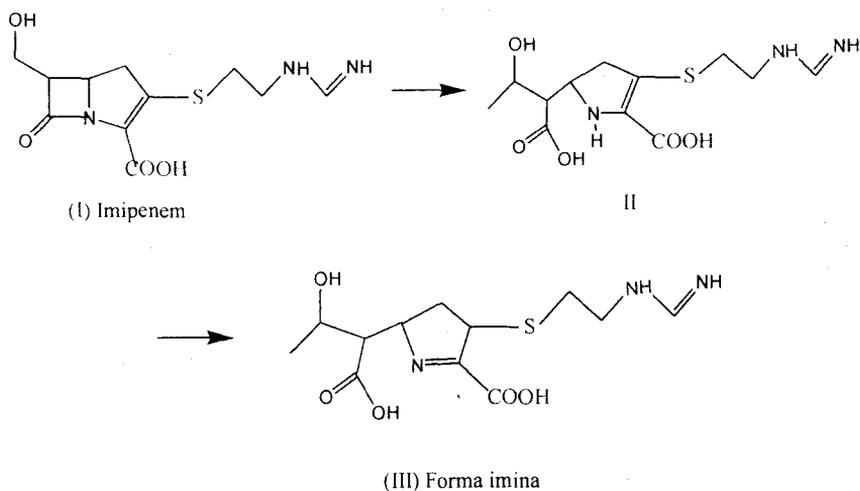
<sup>b</sup>Valores críticos para F y t (p = 0.05).

**IV. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO  
POLAROGRÁFICO Y DETERMINACIÓN  
DE LA FORMA IMINA DEL IMIPENEM  
POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE  
IMPULSO**

#### 4.1. ESTABILIDAD DEL IMPENEM EN SOLUCIÓN

Se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía la baja estabilidad del imipenem en solución. A fin de estabilizar estas soluciones para su medida, es frecuente el uso de diversos buffers biológicos entre los que cabe destacar el MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico) y el HEPES (ácido 4-(2-hidroxietilo)piperazina-1-etanosulfónico), con rangos de aplicación alrededor de pH entre 7 y 8. Asimismo, hay que mencionar que estos estabilizadores se usan también cuando se analiza el principio activo en suero y en tejidos, aunque hay que destacar la no necesidad de su uso para el análisis de imipenem en orina.

Bersier [80] describe la inestabilidad de los carbapenemes en solución y propone el mecanismo de degradación hacia lo que denomina “forma imina”. Para el caso concreto del imipenem, la degradación seguiría el siguiente esquema.



Asimismo, la acción de las dehidropeptidasas en el organismo conduce al mismo producto de degradación (III) [81] aunque no necesariamente a través del mismo mecanismo.

Tanto el imipenem (I) como el producto de degradación con rotura del anillo betalactámico (III) son electroactivas debido al doble enlace del anillo. El imipenem presenta una onda catódica a aproximadamente  $-1.2$  V, aunque poco desarrollada, y que se ve fuertemente afectada (con la desaparición prácticamente completa) por la presencia de los buffers biológicos previamente mencionados. La forma imina del imipenem (III) presenta una onda catódica alrededor de  $-0.3$  V, bien desarrollada, que, al igual que en el caso de imipenem se ve frecuentemente afectada por la presencia de buffers biológicos.

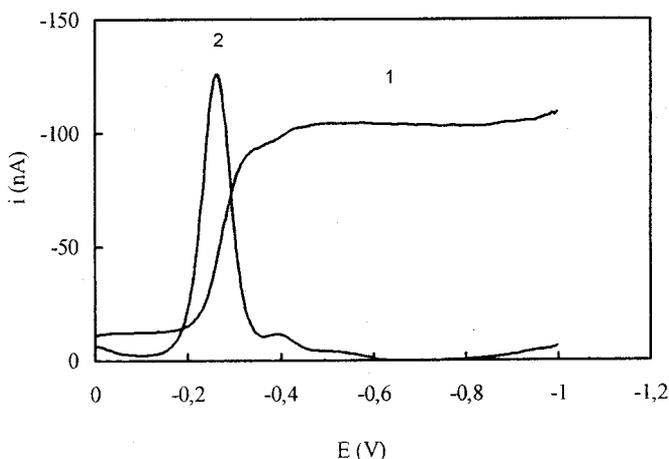
Como conclusión de estudios previos de estabilidad de soluciones acuosas de imipenem, se pudo constatar una rápida degradación hacia la forma imina (III), incluso en soluciones relativamente concentradas, como es el caso de la solución stock  $10^{-3}$  M, en la que se produce una conversión completa alrededor de las dos horas, permaneciendo ya estable la forma imina unas 24 horas a temperatura ambiente, y varias horas en soluciones más diluidas.

Por todo lo expuesto, la propuesta de procedimientos electroquímicos para la determinación de imipenem se plantea a través de la determinación de la correspondiente forma imina, mucho más estable y que proporciona una onda mucho mejor desarrollada, siendo, por tanto, el único requisito para los estudios que se detallan en los próximos apartados. La preparación diaria de solución stock  $10^{-3}$  M de imipenem, y un tiempo de reposo de 2 horas previamente a su uso.

#### **4.2. ESTUDIO POLAROGRÁFICO PREVIO DE LA FORMA IMINA DEL IMIPENEM**

En una serie de estudios polarográficos previos se pudo observar que la forma imina del imipenem presenta una onda catódica a un potencial alrededor de  $-0.31$  V. En la figura 4.1, donde se encuentran representados los polarogramas

tast y DPP correspondientes a una muestra conteniendo 0.75 mg de imipenem, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.0 y agua hasta completar un volumen de 25 ml. Una vez preparada la muestra, se pasa una corriente de nitrógeno durante 10 minutos en la celda polarográfica y se registran los polarogramas por tast y DPP. El barrido se realizó desde 0 hasta  $-1.0$  V, utilizándose una velocidad de barrido de  $5$   $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de  $-50$  mV, en el caso de DPP.



**Figura 4.1** Reducción polarográfica de la forma imina del imipenem a pH 2.  
1) Polarografía tast, 2) Polarografía diferencial de impulso.

### 4.3. INFLUENCIA DEL pH

Se prepararon disoluciones acuosas  $10^{-4}$  M de imipenem a diferentes pH, con la ayuda de tampones fosfato 0.1 M de pH adecuados, registrándose los correspondientes polarogramas tast y DPP entre 0 y  $-1.0$  V, utilizando una velocidad de barrido de  $5$   $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de  $-50$  mV en el caso de DPP.

En las tablas 4.1 y 4.2 se recogen los valores de potencial y potencial de onda media, la intensidad de pico y la intensidad límite obtenidos a distintos valores de pH para la onda de reducción de imipenem.

**Tabla 4.1** Efecto del pH sobre  $E_p$  e  $i_p$  en polarografía diferencial de impulso sobre una disolución  $10^{-4}$  M de imipenem.

pH	$-E_p(V)$	$-i_p(nA)$
1.02	0.20	40.10
1.25	0.22	43.50
1.50	0.24	57.10
1.75	0.25	78.90
2.02	0.28	95.34
2.25	0.30	88.01
2.50	0.33	83.87
3.01	0.37	65.81
3.51	0.42	52.90
4.01	0.48	30.80
4.55	0.53	17.91
5.03	0.60	14.67
5.50	0.64	20.85
6.02	0.70	18.40
6.50	0.74	20.67
7.03	0.76	24.61
7.50	0.78	24.62
8.04	0.80	24.62

**Tabla 4.2** Efecto del pH sobre  $E_{1/2}$  e  $i_i$  en polarografía diferencial de impulso sobre una disolución  $10^{-4}$  M de imipenem.

pH	$-E_{1/2}$ (V)	$-i_i$ (nA)
1.01	0.22	42.49
1.25	0.24	48.01
1.50	0.26	53.20
1.75	0.27	61.03
2.03	0.29	72.50
2.25	0.32	67.58
2.50	0.34	59.77
3.02	0.39	48.84
3.50	0.44	39.50
4.04	0.49	28.26
4.55	0.55	15.26
5.03	0.61	14.84
5.50	0.66	16.60
6.03	0.71	16.05
6.50	0.76	16.90
7.05	0.80	17.40
7.50	0.85	19.50
8.03	0.88	20.01

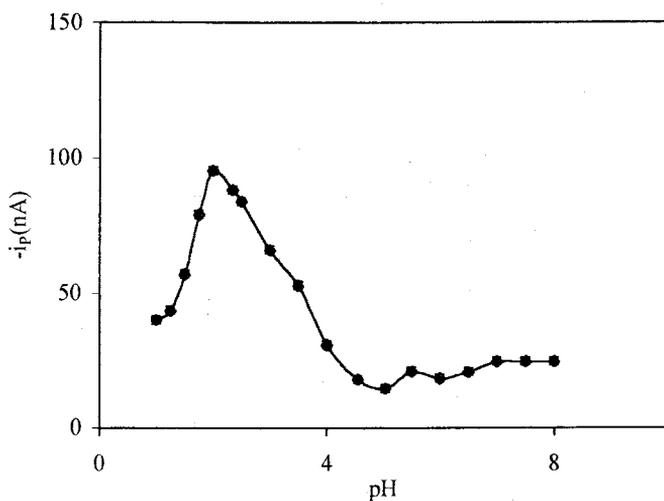
En las figuras 4.2 y 4.3 se representan de la intensidad límite y de pico frente al pH. Las intensidades límites y de pico alcanzan sus valores máximos entre 1.8 y 2.3 decreciendo a pH superiores. Se escoge un valor de pH de 2.0 para estudios posteriores, que se encuentra en el rango de máxima intensidad para la onda.

La representación de potencial de onda media y de pico frente al pH aparece en la figura 4.4 y 4.5 respectivamente. En ellas puede observarse como a medida que el pH aumenta, el potencial de onda media crece hacia valores más negativos. Esta dependencia del pH con el potencial de onda media muestra claramente que los protones participan directamente en los procesos de reducción.

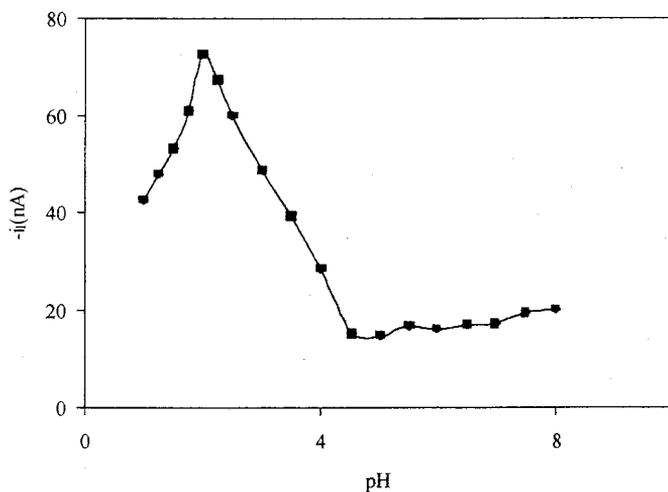
Se observa una dependencia lineal entre el potencial de onda media y el pH en el rango de pH estudiado. Esta dependencia lineal sigue la siguiente ecuación:

$$E_{1/2}(\text{V}) = -0.1024 - 0.0993 \text{ pH} , \quad r = 0.998$$

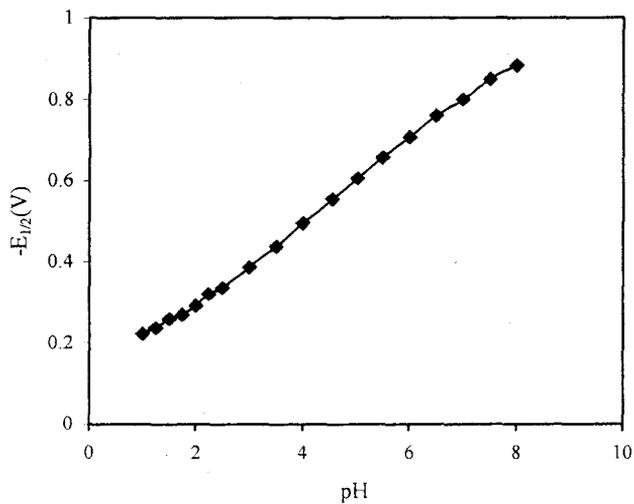
$$E_p(\text{V}) = -0.0709 - 0.1044 \text{ pH} , \quad r = 0.997$$



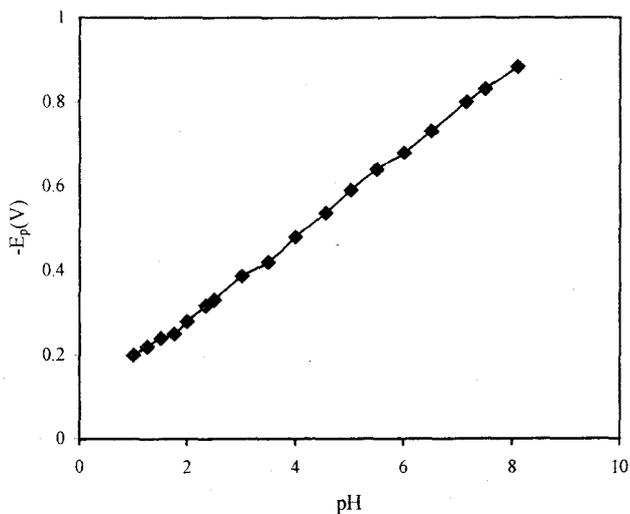
**Figura 4.2** Variación de la intensidad de pico con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem.



**Figura 4.3** Variación de la intensidad límite con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem



**Figura 4.4** Variación del potencial de onda media con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem



**Figura 4.5** Variación del potencial de pico con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem

#### 4.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE GOTEO

Para una altura de depósito prefijada, el tiempo de goteo ( $t_g$ ) está relacionado con el área de la gota (A) a través de:

$$A = k \cdot t_g^{3/2}$$

donde k engloba el valor numérico 0.85 y a la velocidad de flujo a la altura prefijada. Si se mantiene constante la altura del depósito de mercurio y se registran los polarogramas correspondientes a distintos tiempos de goteo, se obtienen intensidades de pico que son función de los mismos.

Se obtendrá, por tanto, la expresión:

$$i_p = f(t_g^{3/2})$$

donde  $i_p$  aumenta conforme lo hace el tiempo de goteo y varía de forma lineal con  $t_g^{3/2}$ .

El estudio de la influencia de este parámetro se realizó preparando en un matraz de 25 ml una muestra  $10^{-4}$  M en imipenem con 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2.0 y agua Milli-Q hasta completar el volumen. Se registraron los polarogramas para unos tiempos de goteos comprendidos entre 0.2 y 2 s, fijando la amplitud de impulso en -50 mV.

En la tabla 4.3 se muestran los valores obtenidos y se comprueba como la intensidad de pico aumenta al aumentar el tiempo de goteo.

**Tabla 4.3** Variación de los valores de las intensidades de pico con el tiempo en polarografía diferencial de impulso.

$t_g$ (s)	$t_g^{2/3}$	$-i_p$ (nA)
0.2	0.34	46.30
0.4	0.54	56.90
0.6	0.71	72.40
0.8	0.86	86.70
1.0	1.02	99.40
1.2	1.13	110.90
1.4	1.25	124.40
1.6	1.37	136.03
1.8	1.48	142.20
1.9	1.53	138.10
2.0	1.59	132.02

En la figura 4.6 se representa la intensidad de pico frente a  $t_g^{2/3}$  observándose una clara dependencia lineal entre las magnitudes representadas. Esta dependencia lineal entre la intensidad de pico y el tiempo de goteo ( $t_g^{2/3}$ ) confirma que el proceso responsable de la reducción de la forma imina del imipenem es principalmente un proceso difusivo. Se fija un tiempo de goteo de 1 s para posteriores experiencias. La ecuación que rige esta dependencia es la siguiente:

$$-i_p = 6.61 + 93.05 t_g^{2/3} \quad r = 0.998$$

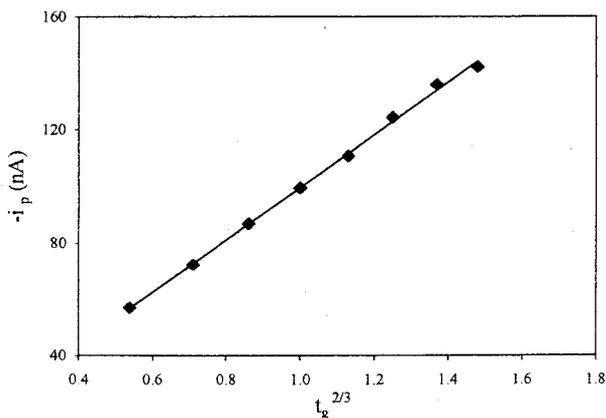


Figura 4.6 Variación de la intensidad de pico con  $t_g^{2/3}$

#### 4.5. INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE IMPULSO APLICADO

Se sabe que cuanto mayor sea el valor de la amplitud de impulso aplicado mayor es la sensibilidad pero menor es la resolución y a la inversa, por lo que hace imprescindible tomar un valor de amplitud de impulso con el que se alcance una buena sensibilidad sin perder resolución.

Para ello, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones  $10^{-4}$  M de imipenem, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2 y se registraron los polarogramas correspondientes entre 0 y -1.0 V, fijando la velocidad de barrido a  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , variando la amplitud de impulso entre -10 y -110 mV. En la tabla 4.4 aparecen los valores correspondientes a las intensidades y potenciales de pico y los correspondientes valores de amplitud de impulso. Puede observarse como a medida que aumenta la amplitud de impulso aplicado el valor de potencial de la onda estudiada se va desplazando hacia valores más positivos.

**Tabla 4.4** Variación de las intensidades y potenciales de pico con la variación de la amplitud de impulso aplicado.

$-\Delta E(\text{mV})$	$-i_p(\text{nA})$	$-E_p(\text{V})$
10	16.25	0.312
20	39.19	0.307
30	64.83	0.297
40	93	0.287
50	120	0.282
60	147.9	0.272
70	174.5	0.267
80	192.6	0.262
90	203.4	0.252
100	205.8	0.242
110	204	0.231

En la figura 4.7 se han representado los valores de las intensidades de pico de onda frente a los valores aplicados de amplitud de impulso. En esta representación se observa la dependencia prácticamente lineal que existe entre la intensidad de pico y la amplitud de impulso en el rango comprendido entre  $-10$  a  $-80$  mV, disminuyendo la intensidad de pico a partir de este valor.

Dentro del rango lineal mencionado, se debe tomar un valor de amplitud de impulso que se utilizará en posteriores estudios. Se eligió  $-50$  mV como valor de amplitud de impulso pues no solo proporciona una elevada intensidad de pico sino que además los picos aparecen bien definidos, cosa que no ocurre a valores superiores de amplitud de impulso.

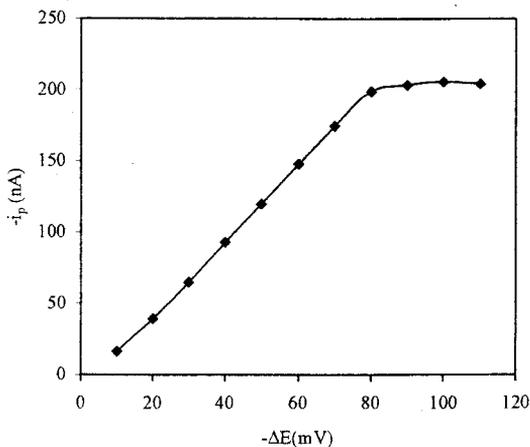


Figura 4.7 Variación de la intensidad de pico de reducción de la forma imina del imipenem en función de la amplitud de impulso aplicado.

#### 4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

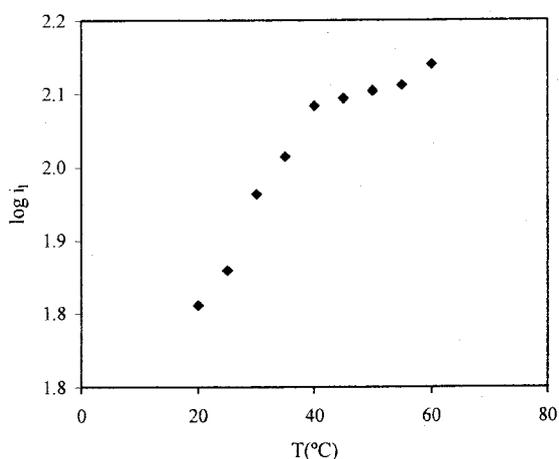
Se estudió la influencia de la temperatura sobre la corriente límite de la onda polarográfica que presenta la forma imina del imipenem y la intensidad de pico en el intervalo comprendido entre  $(25 \pm 1)$  y  $(60 \pm 1)$  °C. Como ya se ha mencionado, esto puede servir para deducir el tipo de corriente que controla el proceso de reducción.

Para ello, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones de imipenem  $10^{-4}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2 y agua hasta el enrase. Las muestras así preparadas se llevaron a la celda polarográfica termostalizada, donde se pasó nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los correspondientes polarogramas mediante las técnicas tast y DPP.

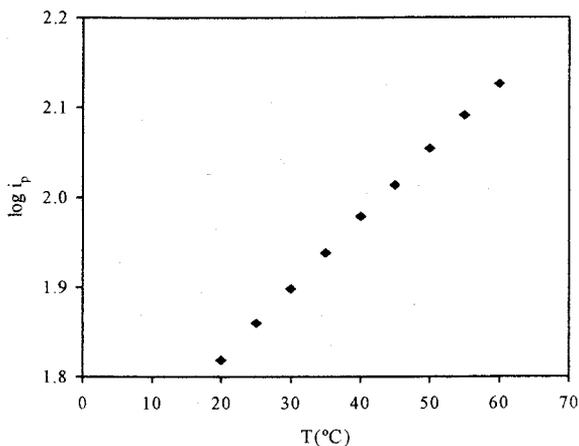
En la tabla 4.5 se recogen los valores de los logaritmos de las intensidades límites y de pico para cada valor de temperatura y en las figuras 4.8 y 4.9 aparecen representados estos datos.

**Tabla 4.5** Variación del logaritmo de la intensidad límite y de pico de la forma imina del imipenem con la temperatura.

Temperatura (°C)	Log $i_p$ (nA)	Log $i_l$ (nA)
20	1.855	1.840
25	1.888	1.877
30	1.919	1.960
35	1.951	2.001
40	1.983	2.057
45	2.011	2.065
50	2.043	2.074
55	2.073	2.079
60	2.101	2.102



**Figura 4.8** Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura



**Figura 4.9** Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura

En la tabla 4.6 se recogen los coeficientes de temperatura, calculados mediante la expresión:

$$T_{coe} \% = \left[ \frac{2.303}{T_2 - T_1} \log \frac{i_2}{i_1} \right] \cdot 100$$

Los valores obtenidos permiten afirmar que la reducción de la forma imina del imipenem corresponden a un proceso controlado por difusión.

**Tabla 4.6** Coeficientes de temperatura de imipenem en polarografía tast y DPP.

	TAST	DPP
Coeficiente de temperatura (%)	1.016 ± 0.02	1.29 ± 0.02

## **4.7. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DEL PROCESO**

En este apartado se ha estudiado la reversibilidad del proceso de reducción de la forma imina del imipenem mediante polarografía *tast*, polarografía diferencial de impulso y voltamperometría cíclica.

### **4.7.1. Estudio de la naturaleza del proceso mediante polarografía *tast***

Los criterios empleados fueron el análisis logarítmico de la función intensidad-potencial y la determinación del valor de  $E_{3/4}-E_{1/4}$ .

Se registraron polarogramas de disoluciones de imipenem  $10^{-4}$  M a pH 2 y a pH 4.5 y sobre los resultados se aplicaron los criterios de reversibilidad, tales como el análisis logarítmico de las curvas (I, E) y el cálculo de  $E_{3/4}-E_{1/4}$ .

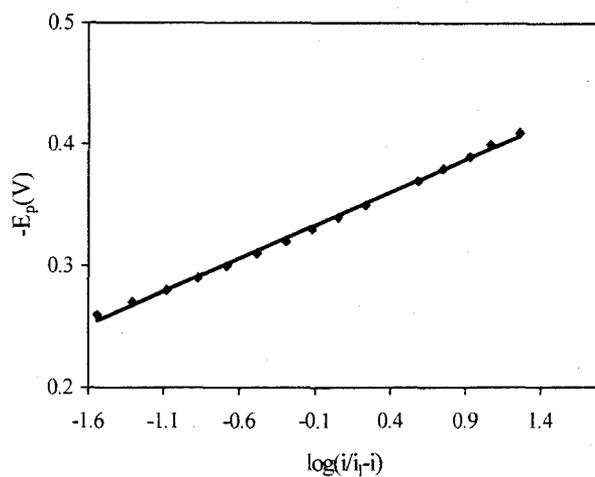
En las tablas 4.7 y 4.8 se muestran los valores obtenidos y en las figuras 4.10 y 4.11 las representaciones correspondientes a pH 2 y 4.5 respectivamente.

**Tabla 4.7** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial de la forma imina del imipenem a pH 2.

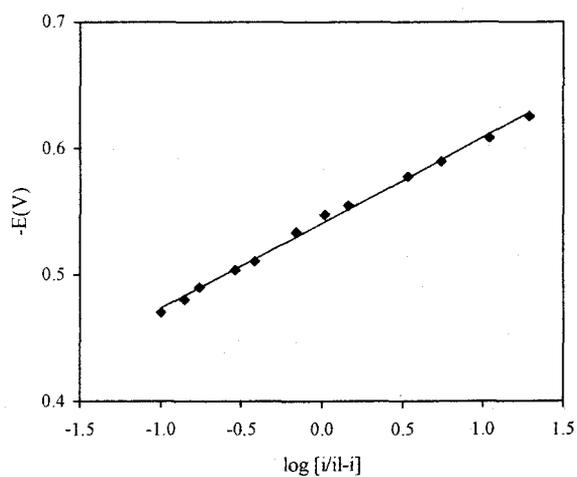
-E(V)	-i(nA) ( $i_r=55.4$ nA)	Log[i/i <sub>r</sub> -i]
0.26	1.56	-1.538
0.27	2.60	-1.308
0.28	4.25	-1.081
0.29	6.56	-0.872
0.30	9.51	-0.684
0.31	13.60	-0.488
0.32	18.60	-0.296
0.33	23.90	-0.120
0.34	29.40	0.053
0.35	35.10	0.238
0.37	44.02	0.587
0.38	47.10	0.754
0.39	49.60	0.932
0.40	51.01	1.064
0.41	52.50	1.258
0.42	54.10	1.619
0.43	54.80	1.961

**Tabla 4.8** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial de la forma imina del imipenem a pH 4.5.

-E(V)	-i(nA) ( $i_r=15.98$ nA)	Log[i/i <sub>r</sub> -i]
0.47	1.45	-1.001
0.48	1.96	-0.850
0.49	2.36	-0.760
0.51	3.54	-0.540
0.52	4.25	-0.460
0.53	6.54	-0.160
0.55	8.12	0.014
0.57	9.43	0.160
0.58	12.32	0.530
0.59	13.54	0.740
0.60	14.65	1.042
0.61	15.21	1.290



**Figura 4.10** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH2



**Figura 4.11** Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 4.5

En ambas figuras se observa una dependencia lineal entre el potencial y el logaritmo del cociente de intensidades, que siguen las ecuaciones siguientes:

$$\text{pH } 2, \quad E = -0.339 - 0.055 \log[i/i_1 - i] \quad r = 0.998$$

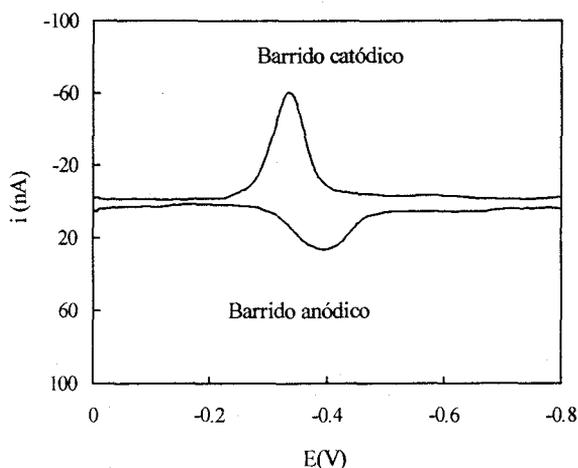
$$\text{pH } 4.5, \quad E = -0.531 - 0.068 \log[i/i_1 - i] \quad r = 0.996$$

Las ordenadas en el origen  $-0.339$  V y  $-0.531$  V coinciden aproximadamente con los potenciales de onda media ( $-0.30$  V) y ( $-0.54$  V) respectivamente, y a través de las pendientes  $-0.055$  y  $-0.068$ , se obtiene un valor de  $\alpha n$  de  $1.12 \pm 0.01$ . En el caso que  $n$  sea igual a 2 se obtiene un valor  $\alpha$  de 0.56, lo que muestra claramente que el proceso que tiene lugar es un proceso irreversible.

Para la determinación del valor de  $E_{3/4} - E_{1/4}$  se ha escogido el polarograma cuyos datos vienen recogidos en la tabla 4.6. Se obtienen valores de  $E_{3/4} - E_{1/4}$  entre 40 y 60 mV por lo tanto, se puede concluir que el proceso es irreversible.

#### **4.7.2. Estudio de la naturaleza del proceso mediante polarografía DPP**

Para llevar a cabo este estudio se ha empleado el Criterio de Birke. En la figura 4.12 se encuentran los polarogramas correspondientes al barrido anódico y catódico (utilizando amplitud de impulso  $+50$  mV para el barrido anódico y  $-50$  mV para el barrido catódico) para una muestra de concentración  $10^{-4}$  M en imipenem y de pH 2.



**Figura 4.12** Estudio de la reversibilidad.criterio de birke aplicado a la onda de reducción de imipenem

En la tabla 4.9 se recogen los valores de potencial de pico anódico y catódico, así como, las correspondientes intensidades.

El cociente entre la altura del pico anódico y el pico catódico es aproximadamente de 0.44, valor menor que 1 y la diferencia entre el potencial del pico catódico menos el potencial del pico anódico es de 56 mV, aproximadamente igual que la amplitud de impulso. Según estos datos, se puede concluir que el proceso de la reducción es irreversible.

**Tabla 4.9** Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke.

Barrido anódico		Barrido catódico	
$i_{pa}(nA)$	$E_{pa}(V)$	$i_{pc}(nA)$	$E_{pc}(V)$
26.08	-0.397	-58.68	-0.341

### 4.7.3. Estudio de la naturaleza del proceso por voltamperometría cíclica

Al objeto de confirmar si el proceso de reducción de la forma imina del imipenem transcurre de forma reversible o irreversible, se prepararon, en matraces de 25 ml, diferentes disoluciones de imipenem  $10^{-4}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2.0, 5.0, 8.0 y agua hasta enrase. Las muestras así preparadas se trasvasaron a una celda polarográfica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos registrándose a continuación los polarogramas mediante voltamperometría cíclica realizando un barrido entre 0 y  $-1.0$  V y una velocidad de barrido de  $300 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En la figura 4.13 se muestran los voltamogramas obtenidos confirmándose el carácter irreversible del proceso de reducción de la forma imina del imipenem, ya que, como puede apreciarse se obtiene únicamente la señal de reducción del barrido catódico, sin aparecer la correspondiente señal de oxidación en el barrido anódico.

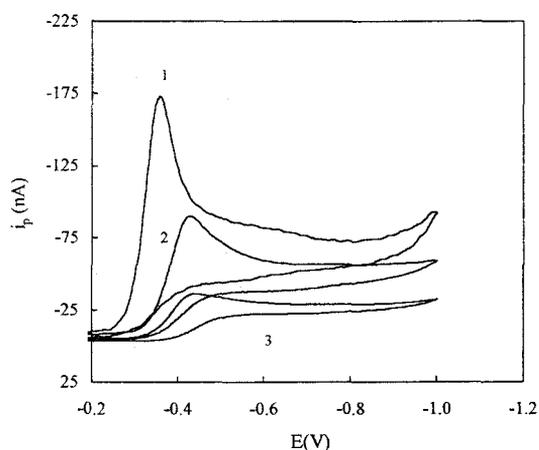


Figura 4.13 Estudio de la reversibilidad mediante voltamperometría cíclica a distintos pH 1) pH 2; 2) pH 5; 3) pH 8.

La dependencia de la intensidad de pico con la velocidad de barrido en voltamperometría cíclica permite establecer la naturaleza de los procesos electroquímicos. En procesos controlados por difusión, la relación lineal se produce entre la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y la intensidad de pico.

Para el estudio de la influencia de la velocidad de barrido en los voltamperogramas cíclicos de la forma imina del imipenem se emplearon 25 ml de una disolución acuosa de imipenem de concentración  $10^{-4}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2.0. Las muestras se trasvasaron a una celda polarográfica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos registrándose a continuación los polarogramas mediante voltamperometría cíclica realizando un barrido entre 0 y  $-1.0$  V modificando la velocidad de barrido entre 10 y 1600  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En la tabla 4.10 se recogen los valores de intensidad y de potencial de pico catódicos obtenidos por cada una de las velocidades de barrido aplicadas para la onda de reducción.

**Tabla 4.10** Variación de la intensidad de pico con la variación de la  $V_b^{1/2}$ .

$V_b$ (mV)	$V_b^{1/2}$ (mV)	$-i_p$ (nA)
10	3.160	19.40
20	4.470	28.59
30	5.477	36.92
40	6.320	43.12
50	7.070	49.86
60	7.746	54.56
70	8.366	61.27
80	8.944	66.54
90	9.487	73.91
100	10.001	76.58
110	10.490	80.01
120	10.950	84.93
130	11.401	89.02
140	11.830	92.39
150	12.250	96.12
200	14.140	117.04
300	17.320	149.70
400	20.002	179.03
500	22.36	206.02
600	24.503	233.01
700	26.460	259.03
800	27.410	273.04
900	30.001	300.01
1000	31.620	317.60
1100	33.160	326.60
1200	34.640	331.60
1300	36.050	336.02
1400	37.416	331.03
1500	38.730	169.70
1600	40.001	145.30

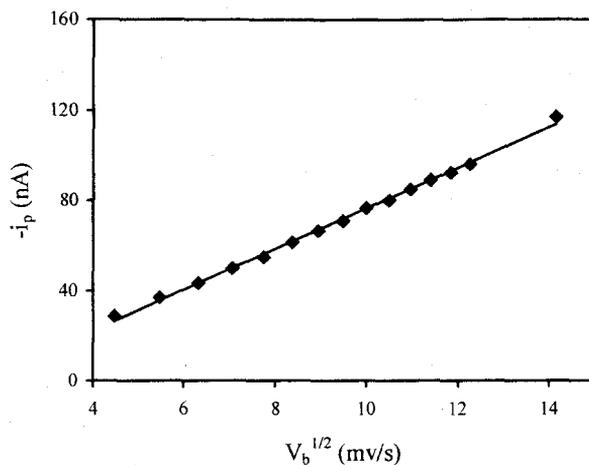


Figura 4.14 Estudio de la velocidad de barrido por voltamperometria cíclica

La representación de la intensidad de pico frente  $V_b^{1/2}$  se muestra en la figura 4.14, que muestra una dependencia lineal entre ambas magnitudes para el voltamperograma de reducción. Se confirma que el proceso responsable de dicha onda está controlado por la difusión de la sustancia electroactiva hacia el electrodo de trabajo.

La ecuación que rige esta dependencia lineal para el voltamperograma de reducción del compuesto objeto de estudio es la siguiente:

$$i_p = 13.69 - 9.02 V_b^{1/2} \quad , r = 0.998$$

#### 4.8. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES

El coeficiente de difusión de una especie electroactiva se puede determinar a partir de las curvas de calibrado obtenidas por polarografía tast, teniendo en cuenta que las corrientes máximas de difusión vienen dadas por la ecuación:

$$i_l = 708 n D^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6} C$$

donde  $i_l$  se mide en amperios,  $n$  es el número de Faradays de electricidad por mol de reactivo,  $m$  es la velocidad del flujo de mercurio en kg/s,  $\tau$  es el tiempo de gota, controlado electrónicamente, en segundos,  $C$  es la concentración de reactivo en mol/m<sup>3</sup> y el coeficiente 708 agrupa varias constantes.

El método consiste en representar la corriente de difusión en función de la concentración de la especie electroactiva, manteniendo constante los demás parámetros. A partir del valor obtenido para la pendiente de la recta,  $P$ , se calcula el valor del coeficiente de difusión,  $D$ , mediante la expresión:

$$D = \left[ \frac{P}{(708 n m^{2/3} \tau^{1/6})} \right]^2$$

donde  $m = 4.55 \times 10^{-7}$  kg/s y  $\tau = 1$  s.

Para el cálculo de dicho coeficiente de difusión se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones  $10^{-5}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$ ,  $8 \cdot 10^{-5}$  M conteniendo además 5 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 2 y disoluciones de igual concentración

conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 5, registrándose los correspondientes polarogramas tast realizando un barrido entre 0 y-1.0 V.

En la tabla 4.11 se exponen los valores de intensidad límite obtenidos para la onda con las distintas concentraciones y para los dos valores de pH ensayados.

**Tabla 4.11** Variación de la intensidad límite con la concentración de la forma imina del imipenem.

Concentración (M)	$-i_l(\text{nA})$	
	pH 2	pH 5
$10^{-5}$	5.20	3.20
$2 \cdot 10^{-5}$	13.20	5.50
$4 \cdot 10^{-5}$	22.80	7.97
$6 \cdot 10^{-5}$	31.68	10.56
$8 \cdot 10^{-5}$	41.60	13.20

En las figuras 4.15 y 4.16 se representan estos valores, observándose una dependencia lineal entre la intensidad límite de onda y la concentración de imipenem para los dos pH ensayados.

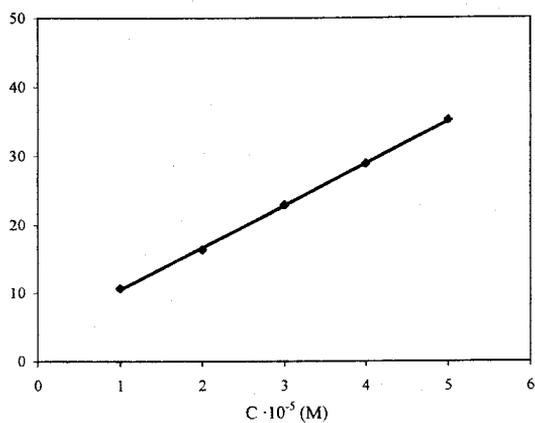


Figura 4.15 Variación de intensidad límite con la concentración de la forma imina del imipenem a pH 2

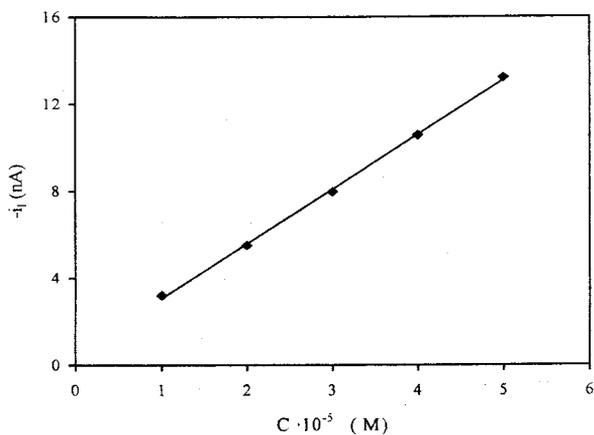


Figura 4.16 Variación de intensidad límite con la concentración de la forma imina del imipenem a pH 5

Sustituyendo los valores de las pendientes de estas rectas en la expresión anterior, se obtienen los resultados recogidos en la tabla 4.12 para el coeficiente de difusión.

**Tabla 4.12** Cálculo del coeficiente de difusión de la forma imina del imipenem para pH 2 y pH 5

pH	Ecuación de la recta	Coficiente de difusión ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )
2	$i_i = -4.37 - 6.15C, \quad r = 0.9997$	$1.52 \cdot 10^{-11}$
5	$i_i = -0.568 - 2.506C, \quad r = 0.9992$	$6.20 \cdot 10^{-12}$

Una vez calculados los potenciales iniciales y finales y el coeficiente de difusión, se realiza la cronocoulombimetría para cada una de las concentraciones utilizadas en el cálculo del coeficiente de difusión, aplicando estos potenciales. Los valores de  $Q$  y  $t^{1/2}$  obtenidos son representados con el fin de calcular el número de electrones a través de la pendiente de dicha gráfica que coincide con la expresión  $2nFAD^{1/2}C_{ox}^*/\pi^{1/2}$ , donde  $C_{ox}^*$  es la concentración de la especie electroactiva fuera de la capa de difusión. Sustituyendo en esta ecuación y despejando  $n$  obtendríamos el número de electrones que participan en el proceso de reducción de imipenem.

En la tabla 4.13 se muestran los valores calculados para el número de electrones  $n$  para cada concentración y para los valores de pH 2 y pH 5.

**Tabla 4.13** Calculo del número de electrones mediante cronoculombimetría a pH 2 y pH 5

Concentración (M)	Número de electrones	
	pH 2	pH 5
$10^{-5}$	2.31	2.06
$2 \cdot 10^{-5}$	2.21	2.27
$4 \cdot 10^{-5}$	2.19	2.16
$6 \cdot 10^{-5}$	2.13	2.08
$8 \cdot 10^{-5}$	1.89	1.93
nº medio electrones	$2.15 \pm 0.21$	$2.10 \pm 0.13$

#### 4.9. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PROTONES

Al objeto de proponer el mecanismo de reducción de la forma imina del imipenem, es necesario calcular el número de protones,  $p$ , que intervienen en el proceso, que se calculan a partir del parámetro  $\alpha n$ , obtenido mediante el análisis logarítmico de la función intensidad-potencial.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon muestras de concentración  $10^{-4}$  M, variando el valor de pH entre 3 y 7. Las muestras así preparadas fueron trasvasadas a una celda polarográfica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos registrándose los correspondientes polarogramas entre 0 y  $-1.0$  V usando la técnica polarográfica tast. El valor de  $\alpha n$  obtenido para el rango de pH estudiado fue  $1.15 \pm 0.01$ .

Una vez conocido el valor del parámetro  $\alpha n$  se calcula el número de protones que participan en el proceso de reducción de imipenem a partir de la siguiente expresión:

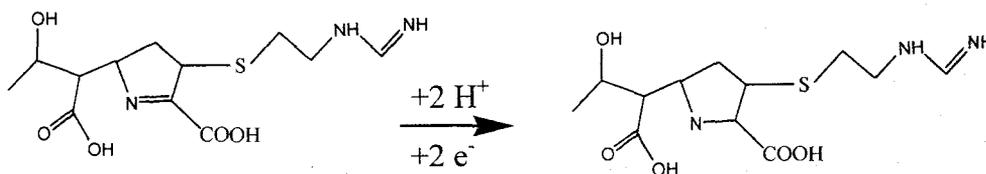
$$\frac{\Delta E_{1/2}}{\Delta pH} = \frac{0.059 p}{\alpha n}$$

Se obtiene un valor de  $p$  (nº de protones) de  $2.12 \pm 0.1$ .

#### 4.10. MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMIPENEM

De los datos obtenidos en los apartados anteriores, se concluye que la forma imina del imipenem presenta una onda de reducción a  $-0.3$  V en la que se encuentran implicados dos electrones y dos protones.

De acuerdo con el valor de potencial, y a diferencia del mecanismo propuesto para la reducción de otros penemes y carbapenemes [80], lo más factible es la reducción directa del doble enlace  $C=N$  del resto de anillo betalactámico que puede en la forma amina.



De acuerdo con el mecanismo de degradación de imipenem propuesto en el apartado 4.10, la reducción debe ir a través de la forma tautómera (III), ya que si fuese a través de la forma (II), el mecanismo debería ser similar al del imipenem no degradado, y la diferencia de potencial entre ambas ondas de reducción es notable.

#### 4.11. RECTA DE CALIBRADO

Se ha estudiado mediante polarografía diferencial de impulso la influencia de la concentración siguiendo la variación que se produce en la intensidad de pico. La  $i_p$  viene dada por la ecuación:

$$i_p = nFAC_{ox} \sqrt{\frac{D \sigma - 1}{\pi t, \sigma + 1}}$$

donde  $\sigma = e^{\frac{nF \Delta E}{RT}}$ , siendo  $\Delta E$  la amplitud de impulso. El máximo valor que puede tomar  $(\sigma-1)/(\sigma+1)$  obtenido para altas amplitudes de impulso es la unidad, y la expresión se transforma en la ecuación de Cottrell, obteniéndose una onda y no un pico.

Si mantenemos constantes todos los parámetros excepto la concentración de la especie electroactiva tendremos que, para una onda de difusión,  $i_p$  es una función de la concentración.

Para comprobar esta relación, se preparan muestras, en matraces de 25 ml conteniendo la forma imina del imipenem entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M, 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2.0 y agua hasta enrase. Las muestras así preparadas son

llevadas a una celda polarográfica donde se desoxigenan pasando nitrógeno durante 10 minutos, registrándose los correspondientes polarogramas entre 0 y  $-1.0\text{ V}$ , fijando una  $V_b$   $5\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $\Delta E$   $-50\text{ mV}$ .

En la figura 4.17 se muestra la relación existente entre la concentración de la forma imina del imipenem y la intensidad de pico.

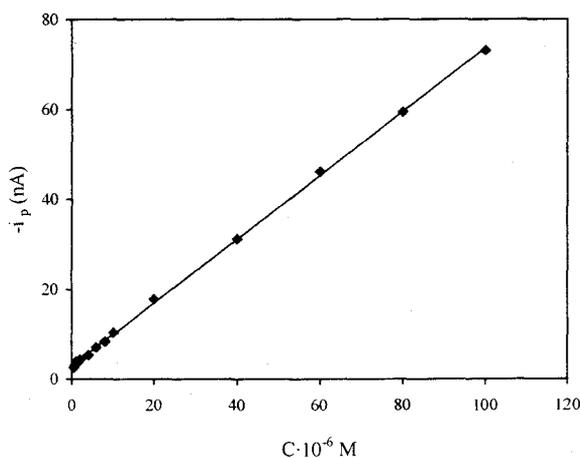


Figura 4.17 Variación de la intensidad de pico con la concentración de la forma imina del imipenem

En el rango de concentraciones estudiado existe una relación lineal entre la concentración y la intensidad de pico entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M, por lo que el calibrado se realiza para este rango de concentraciones.

En la figura 4.18 se muestra la recta de calibrado obtenida a partir de triplicados preparados y medidos en la forma previamente descrita. La expresión de la ecuación obtenida tras el ajuste por mínimos cuadrados, es la siguiente:

$$-\Delta i_{max} = (0.928 \pm 0.337) + (0.935 \pm 0.007) C \quad , r = 0.9996$$

donde  $-\Delta i_{max}$  en nA y C en  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

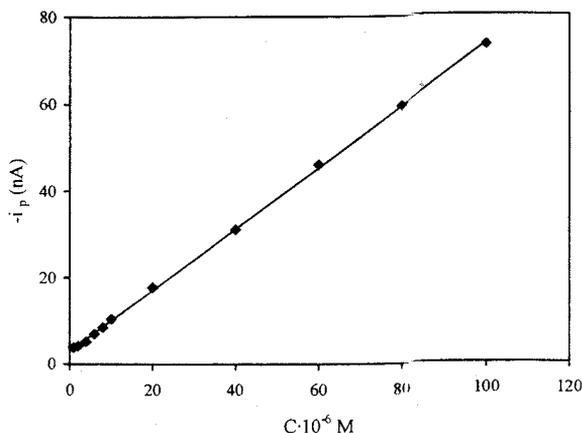


Figura 4.18 Recta de calibrado de la forma imina del imipenem

## 4.12. REPRODUCIBILIDAD

Para conocer la reproducibilidad del método propuesto se prepararon dos series de 9 muestras iguales en matraces de 25 ml de concentraciones  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M de la forma imina del imipenem, 5 ml de tampón de fosfato de pH 2, registrándose los correspondientes polarogramas como en apartados anteriores y obteniéndose los valores de intensidad de pico. Los parámetros estadísticos, valor medio de la señal ( $y_m$ ); desviación estándar ( $s$ ); y desviación estándar relativa (%E) se recogen en la tabla 4.14, y fueron calculados de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$y_m = \sum_{i=1}^n y_i \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_m)^2}{n-1}} \quad \%E = \frac{s}{y_m} 100$$

**Tabla 4.14** Reproducibilidad. Cálculo de parámetros estadísticos

	Concentración $10^{-5}$ (M)	Concentración $10^{-4}$ (M)
$y_m$ (nA)	11.64	93.512
s (nA)	0.287	2.62
%E	2.47	2.8

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que la precisión del método es similar tanto a altas como a bajas concentraciones.

#### 4.13. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se calculó el límite de detección ( $X_{LOD}$ ) y el límite de cuantificación ( $X_{LOQ}$ ) a partir de la ecuación de la recta de calibrado obtenida en el apartado 4.9. Los valores de intensidad de pico correspondientes al límite de detección ( $y_{LOD}$ ) y cuantificación ( $y_{LOQ}$ ) se calculan a partir del valor de la desviación estándar de la señal del blanco, que viene dada por la siguiente expresión:

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

donde  $y_i$  son los valores de la intensidad de pico obtenidos para cada concentración  $x_i$  son los valores de intensidad de pico calculados a partir de la recta de regresión y  $n$  es el tamaño muestral [78].

$$y_{LOD} = a + 3 S_B$$

$$x_{LOD} = (y_{LOD} - a)/b$$

$$y_{LOQ} = a + 10 S_B$$

$$x_{LOQ} = (y_{LOQ} - a)/b$$

donde  $a$  es la ordenada en el origen y  $b$  la pendiente de la recta de calibrado. Con estos datos se obtiene un límite de detección de  $4.5 \cdot 10^{-7}$  M y un límite de cuantificación de  $1.5 \cdot 10^{-6}$  M.

#### **4.14. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMIPENEM**

En un matraz de 25 ml se pone una cantidad de la forma imina del imipenem correspondiente a entre 7.48 y 748.4  $\mu\text{g}$  de imipenem, se añaden 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 2.0, y se enrasa con agua desionizada. Las muestras se colocan en una celda polarográfica, registrándose los correspondientes polarogramas, entre 0 y  $-1.0$  V después de desoxigenar durante diez minutos con una corriente de nitrógeno puro, frente al electrodo de Ag/AgCl saturado mediante la técnica de polarografía diferencial de impulso. Los polarogramas se registran fijando una amplitud de impulso en  $-50$  mV y una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ . Por comparación con la correspondiente recta de calibrado, obtenida en iguales condiciones se determina la concentración de la forma imina del imipenem.

#### **4.15. DETERMINACIÓN DE IMIPENEM EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS**

Previamente a la determinación, se procedió a comprobar si la cilastatina podría interferir en la misma, ya que todas las preparaciones farmacéuticas de imipenem contienen dicho compuesto en la misma proporción en peso ya que su coadministración inhibe la degradación por efecto de las dehidropeptidasas del organismo. Se comprueba que cantidades de cilastatina hasta 10 veces mayores a

las de imipenem no producen interferencia en la determinación del mismo a través de su forma imina. Asimismo, la presencia de cilastatina no modifica, en modo alguno, la degradación química del imipenem en solución acuosa hace la forma imina.

Se analizaron por triplicado 3 muestras de cada una de las formulaciones farmacéuticas que contienen imipenem presentes en el mercado. TIENAM<sup>®</sup> 250/250 mg y TIENAM<sup>®</sup> 500/500 mg.

Para ello, se disolvió el preparado en agua destilada y se tomaron las alícuotas necesarias para su determinación por polarografía diferencial de impulso tras una espera de aproximadamente 2 horas, a fin de garantizar la degradación completa del imipenem a su forma imina.

El imipenem presente en las preparaciones fue también determinado mediante un procedimiento por HPLC [59].

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 4.15, apreciándose una muy buena concordancia entre los resultados obtenidos por DPP y las correspondientes determinaciones mediante HPLC, contrastado estadísticamente mediante la aplicación del ensayo t para comparar dos medias experimentales y el ensayo F de dos colas para la comparación de la precisión.

**Tabla 4.15** Análisis de imipenem en preparaciones farmacéuticas.

	DPP			HPLC
	Calculado <sup>(a)</sup>	F <sub>test</sub>	t <sub>test</sub>	Calculado <sup>(a)</sup>
TIENAM <sup>®</sup> 250/250 mg	246 ± 6	3.21	0.26	248 ± 5
	253 ± 5	4.00	0.27	247 ± 7
	261 ± 3	1.78	0.05	251 ± 8
TIENAM <sup>®</sup> 500/500 mg	505 ± 7	1.44	0.20	512 ± 6
	518 ± 9	4.15	0.31	522 ± 8
	521 ± 5	1.85	0.23	519 ± 9
		39.00 <sup>(b)</sup>	2.78 <sup>(b)</sup>	

<sup>(a)</sup>Media de tres determinaciones ± desviación estándar

<sup>(b)</sup>Valores críticos para F y t (p = 0.05)

**V. DETERMINACIÓN DE CEFMINOX POR  
VOLTAMPEROMETRÍA DE  
REDISOLUCIÓN ADSORTIVA CATÓDICA**

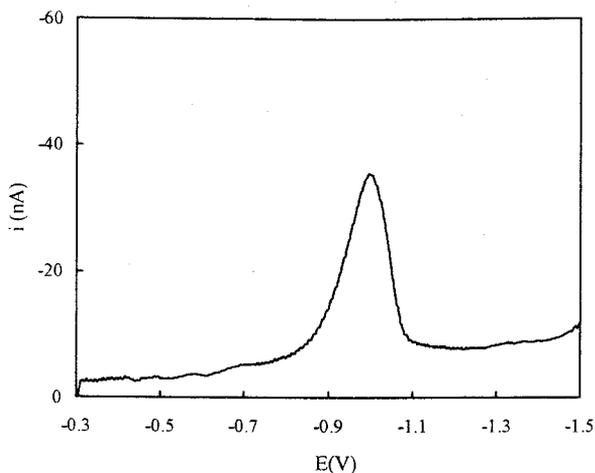
En este capítulo se describe el estudio de la adsorción y posterior reducción del cefminox adsorbido en el electrodo de gota de mercurio suspendida (HMDE), hecho que va a permitir poner a punto un método analítico de determinación de dicho compuesto utilizando voltametría de redisolución catódica de barrido lineal (CAdSLSV), así como su determinación en fluidos biológicos.

## 5.1. ESTUDIO PREVIO DEL CEFMINOX

En una serie de estudios previos se pudo comprobar que la técnica más adecuada en la etapa de medida es la voltamperometría de barrido lineal. En la figura 5.1, se encuentra representado el voltamograma correspondiente a la voltamperometría de barrido lineal perteneciente a una muestra  $10^{-7}$  M de cefminox conteniendo 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 6.0 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml

Una vez preparada la muestra, se trasvasó a la celda polarográfica donde se le hizo pasar una corriente de nitrógeno durante 10 minutos, tras lo cual se dispusieron las condiciones necesarias para la medida y registro de los voltamogramas. El barrido se realizó desde 0 hasta  $-1.5$  V, utilizándose un potencial de acumulación de  $-0.4$  V, un tiempo de deposición de 15 s y un tiempo de reposo de 10 s.

Como puede observarse aparece una onda de reducción para el cefminox a potencial  $-1.0$  V. El estudio voltamperométrico se centró, al igual que en el estudio por DPP, en esta onda debido a su mejor definición.



**Figura 5.1** Voltamograma de barrido lineal de cefminox  $10^{-7}$  M a pH 6

## 5.2. INFLUENCIA DEL pH

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones acuosas de distintos valores de pH entre 2.2 y 11.7, añadiendo volúmenes variables de ácido fosfórico 1 M e hidróxido potásico 1 M hasta un volumen total de 5 ml. La concentración de cefminox en 25 ml de las disoluciones fue  $10^{-6}$  M. Posteriormente se registraron los correspondientes voltamogramas entre 0 u  $-1.5$  V, utilizando un potencial de acumulación de  $-0.4$  V, un tiempo de deposición de 15 s y un tiempo de reposo de 10 s.

En la tabla 5.1, se recogen los valores de la intensidad y del potencial de pico del cefminox a diferentes valores de pH. Se elige como pH óptimo 6.0 ya que la intensidad máxima corresponde a dicho pH, y los picos están bien definidos y la línea base está bien establecida.

**Tabla 5.1** Efecto del pH en la intensidad y potencial de pico mediante voltametría de barrido lineal de cefminox  $10^{-6}$  M.

pH	$-i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
2.2	6.30	0.820
4.0	18.03	0.834
6.0	81.07	1.046
6.5	54.64	1.050
8.1	46.33	1.096
10.0	33.06	1.081
11.7	21.75	1.056

### 5.3. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN

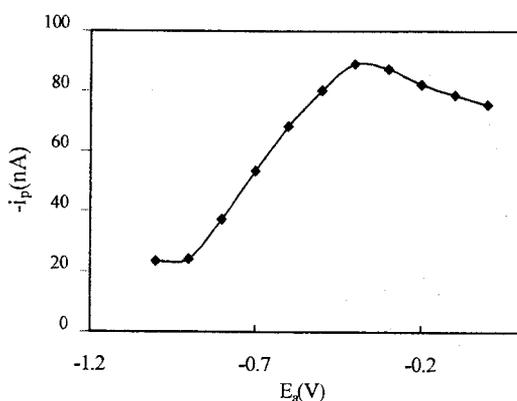
Se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de cefminox de concentración  $10^{-7}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 6.0 y agua hasta el enrase. Las muestras así preparadas se llevaron a la celda polarográfica termostatizada, donde se pasó nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los correspondientes polarogramas entre 0 y  $-1.5$  V mediante la técnica CADSV de barrido lineal, variando el potencial de acumulación entre  $-1$  y 0, y manteniendo el tiempo de deposición en 15 s y el tiempo de reposo en 10 s.

En la tabla 5.2 aparecen los valores correspondientes a la intensidad de pico y los correspondientes valores de potencial de acumulación.

**Tabla 5.2** Variación de la intensidad de pico con el potencial de acumulación.

$E_{ac}$ (V)	$-i_p$ (nA)
-0.0	75.60
-0.1	78.70
-0.2	82.30
-0.3	87.30
-0.4	88.99
-0.5	80.20
-0.6	68.20
-0.7	53.20
-0.8	37.40
-0.9	24.26
-1.0	23.46

En la figura 5.2 se han representado los valores de la intensidad de pico frente a los valores aplicados de potencial de acumulación. Como puede observarse, el potencial de acumulación va creciendo hasta alcanzar un máximo de  $-0.4$  V y decrece ligeramente a valores más positivos. Por ello se elige un potencial de deposición de  $-0.4$  V para estudios posteriores.



**Figura 5.2** Variación de la intensidad de pico del cefminox con el potencial de acumulación

## 5.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE DEPOSICIÓN

En la técnica de stripping o redisolución, el tiempo de deposición es un parámetro clave a la hora de obtener respuestas sensibles y reproducibles, generalmente, la intensidad de la señal de redisolución debe crecer con el aumento del tiempo de preelectrolisis, hasta que se alcanza un límite de saturación de la gota.

Para realizar el estudio de este parámetro, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones entre  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 6 y se registraron los voltamogramas correspondientes entre 0 y  $-1.5$  V, variando el tiempo de deposición entre 0 y 60 s según la concentración, y manteniendo el potencial de acumulación en  $-0.4$  V y el tiempo de reposo en 10 s. En la figura 5.3 se representan los voltamogramas de una disolución de cefminox  $10^{-6}$  M a distintos tiempos de deposición.

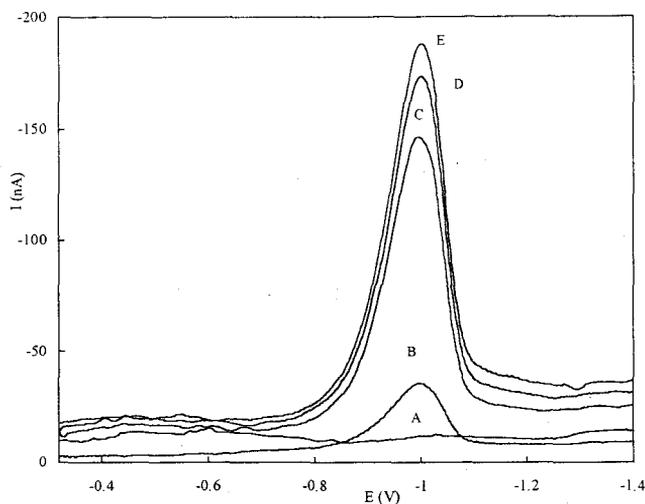


Figura 5.3 Voltamogramas de cefminox  $10^{-6}$  M al variar el tiempo de deposición. (A: 0 s; B: 15 s; C: 30 s; D: 45 s; E: 60 s)

En la figura 5.4 se representan los valores de la intensidad de pico frente al tiempo de deposición, para diferentes concentraciones de cefminox. Se observa que para cada concentración existe una zona de aumento lineal de la intensidad de pico con el tiempo de deposición, y una zona en la cual se pierde esta linealidad debido a la saturación de la gota de mercurio. Se elige como tiempo de deposición óptimo 15 s.

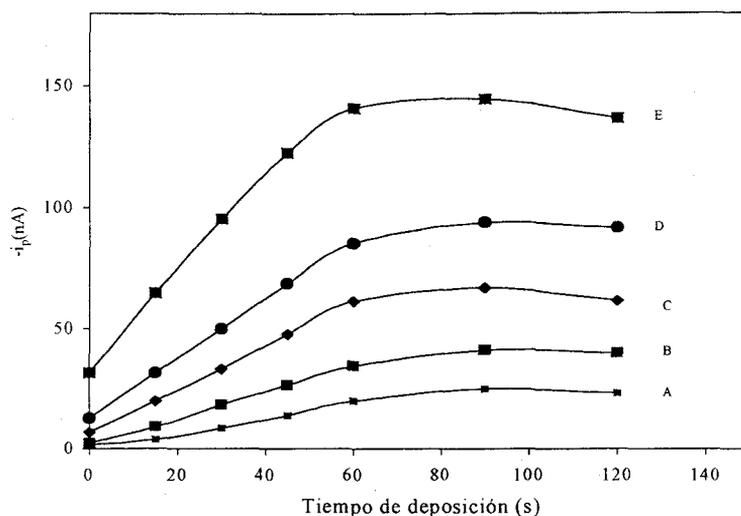


Figura 5.4 Influencia del tiempo de deposición sobre la intensidad de pico del cefminox (A:  $10^{-9}$  M; B:  $10^{-8}$  M; C:  $10^{-7}$  M; D:  $5 \cdot 10^{-7}$  M; E:  $10^{-6}$  M).

## 5.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REPOSO

Para estudiar la influencia del tiempo de reposo se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de cefminox de concentración  $10^{-7}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 6 y se registraron los voltamogramas correspondientes entre 0 y  $-1.5$  V, variando el tiempo de reposo entre 5 y 40 s, y manteniendo el potencial de acumulación en  $-0.4$  V y el tiempo de deposición a 15 s.

Los valores correspondientes a la variación del tiempo de reposo con respecto a la intensidad y potencial de pico, se encuentran en la tabla 5.3. Se observa, que en el rango estudiado, no existe grandes variaciones con respecto al potencial de pico. Para estudios posteriores se elige 10 s como tiempo de reposo.

**Tabla 5.3** Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación del tiempo de reposo en cefminox  $10^{-7}$  M.

Tiempo de equilibrado (s)	$-i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
5	30.9	0.978
10	31.8	0.982
20	32.1	0.981
30	31.6	0.984
40	31.5	0.983

## 5.6. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO

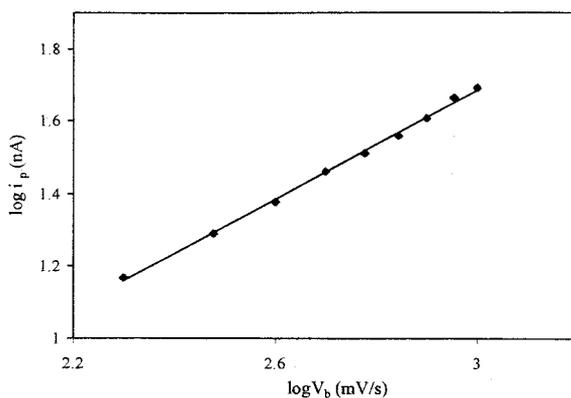
Para estudiar la influencia de la velocidad de barrido se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de cefminox de una concentración de  $10^{-6}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 6 y se registraron los voltamogramas correspondientes entre 0 y -1.5 V, variando la velocidad de barrido entre 10 y 1100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , y manteniendo el potencial de acumulación en un valor de -0.4 V, el tiempo de deposición en 15 s y el tiempo de reposo en 10 s.

En la tabla 5.4, se encuentran recogidos los valores correspondientes a la variación del log de  $V_b$  con respecto a la intensidad y potencial de pico, y en las figuras 5.5 y 5.6 se representan el log de  $i_p$  y el potencial de pico frente al log de  $V_b$  respectivamente. Como puede apreciarse, a medida que aumenta la velocidad

de barrido aumenta la intensidad y el potencial de pico de forma lineal, con coeficientes de correlación de 0.998 y 0.996, respectivamente. Para estudios posteriores se elige una velocidad de barrido de  $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Tabla 5.4** Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación de la velocidad de barrido en el cefminox  $10^{-6} \text{ M}$ .

$V_b$ ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$-i_p$ (nA)	$\log V$ ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	$\text{Log} i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
100	13.15	2.00	1.12	0.97
200	14.69	2.30	1.17	0.99
300	19.50	2.48	1.29	1.03
400	23.88	2.60	1.38	1.01
500	28.84	2.70	1.46	1.02
600	32.36	2.78	1.51	1.02
700	36.14	2.85	1.56	1.03
800	40.36	2.90	1.61	1.04
900	48.20	2.95	1.68	1.04
1000	51.40	3.00	1.71	1.05
1100	54.36	3.04	1.74	1.05



**Figura 5.5** Variación del  $\log i_p$  con el  $\log V_b$

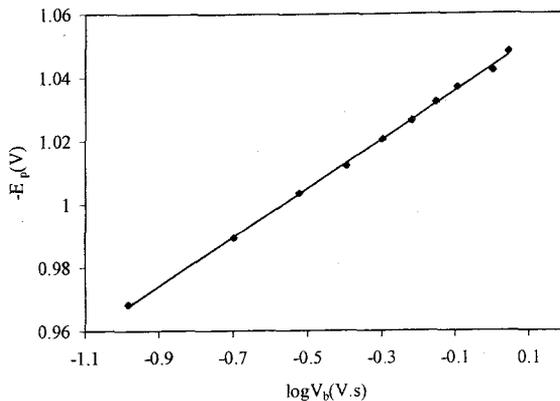
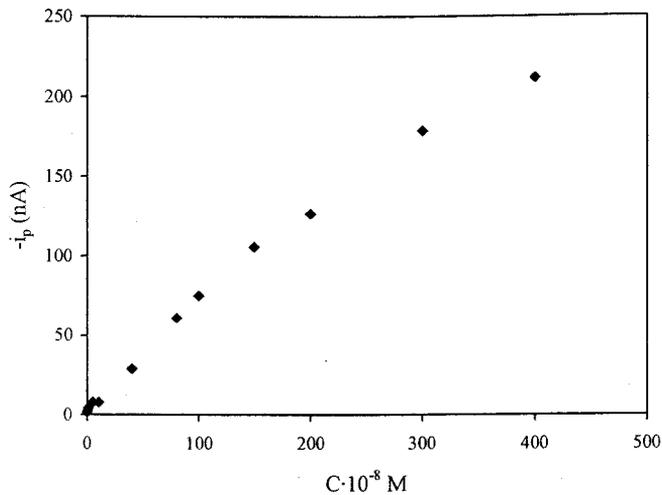


Figura 5.6 Variación de  $-E_p$  con el  $\log V_b$

## 5.7. RECTA DE CALIBRADO

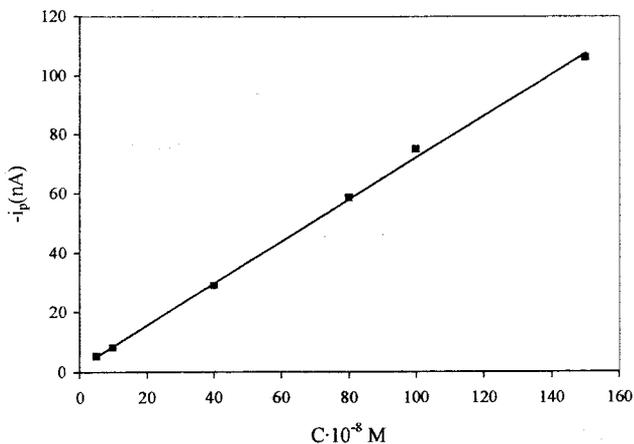
Una vez optimizados los parámetros instrumentales propios de la técnica utilizada se procedió al establecimiento de una recta de calibrado en las condiciones anteriormente fijadas ( $E_{ac} -0.4$  V, tiempo de acumulación de 15 s, tiempo de reposo de 10 s y velocidad de barrido de  $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Para ello se prepararon muestras, en matraces de 25 ml, conteniendo cefminox de distintas concentraciones entre  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  M y 5 ml de tampón fosfato de pH 6.0. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda polarográfica donde se desoxigenan pasando nitrógeno durante 10 minutos, registrándose los correspondientes voltamogramas entre 0 y  $-1.5$  V.

En la figura 5.7 se muestra la relación existente entre la concentración del cefminox y la intensidad de pico.



**Figura 5.7** Variación de la intensidad de pico con la concentración de cefminox

En el rango de concentraciones estudiado existe una relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración entre  $5.0 \cdot 10^{-8}$  y  $1.5 \cdot 10^{-6}$  M, por lo que el calibrado se realiza para este rango de concentraciones. En la figura 5.8 se muestra la recta de calibrado obtenida a partir de triplicados preparados y medidos de la misma forma que en el párrafo anterior.



**Figura 5.8** Recta de calibrado de cefminox

La expresión de la ecuación de la recta obtenida tras el ajuste por mínimos cuadrados es la siguiente:

$$-\Delta i_{max} = (1.9 \pm 0.1) + (0.71 \pm 0.02) C \quad , r = 0.9986$$

donde  $-\Delta i_{max}$  se expresa en nA y C en  $10^{-8}$  M.

## 5.8. REPETITIVIDAD

Para conocer la repetitividad del método propuesto se prepararon, en matraces de 25 ml, 11 muestras iguales  $10^{-7}$  M de cefminox, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 6 y registrándose los correspondientes voltamogramas como en apartados anteriores y obteniéndose los valores de intensidad. Los parámetros estadísticos, valor medio de la señal ( $y_m$ ); desviación estándar (s); y desviación estándar relativa (%E) se recogen en la tabla 5.5, y fueron calculados de acuerdo a las expresiones del apartado 3.13.

**Tabla 5.5** Repetitibilidad. Cálculo de parámetros estadísticos.

	Concentración $10^{-7}$ M
$y_m$ (nA)	102.08
s (nA)	4.41
%E	4.32

## 5.9. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se calculó el límite de detección ( $X_{LOD}$ ) y el límite de cuantificación ( $X_{LOQ}$ ) a partir de la recta de calibrado obtenida en el apartado 5.7. Los valores de intensidad de pico correspondientes al límite de detección ( $y_{LOD}$ ) y cuantificación

( $y_{LOQ}$ ) se calculan a partir del valor de la desviación estándar de la señal del blanco, que viene dada por la siguiente expresión:

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

donde  $y_i$  son los valores de la intensidad de pico obtenidos para cada concentración,  $\hat{y}_i$  son los valores de intensidad de pico calculados a partir de la recta de regresión y  $n$  es el tamaño muestral.

$$y_{LOD} = a + 3 S_B$$

$$x_{LOD} = (y_{LOD} - a)/b$$

$$y_{LOQ} = a + 10 S_B$$

$$x_{LOQ} = (y_{LOQ} - a)/b$$

donde  $a$  es la ordenada en el origen y  $b$  la pendiente de la recta de calibrado. Con estos datos se obtiene un límite de detección de  $2.47 \cdot 10^{-8}$  M y un límite de cuantificación de  $8.25 \cdot 10^{-8}$  M.

## 5.10. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE CEFMINOX

En matraces de 25 ml se pone una cantidad de cefminox comprendida entre 1.12 y 20.31  $\mu\text{g}$ , se añaden 5 ml de tampón fosfato de pH 6 y se enrasa con agua desionizada. Las muestras se colocan en una celda polarográfica, registrándose los correspondientes voltamogramas, entre 0 y -1.5 V después de desoxigenar durante 10 minutos con una corriente de nitrógeno puro, frente al electrodo de gota de mercurio suspendida (HMDE) mediante la técnica de

voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica de barrido lineal (CAdSLSV). Los voltamogramas se registran fijando una velocidad de barrido en  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , el potencial de preconcentración en  $-0.4 \text{ V}$ , el tiempo de acumulación en  $15 \text{ s}$  y el tiempo de reposo en  $10 \text{ s}$ . Por comparación con la correspondiente recta de calibrado, obtenida en iguales condiciones se determina la concentración de cefminox.

## **5.11. DETERMINACIÓN DE CEFMINOX EN ORINA**

### **5.11.1. Procedimiento**

Se toma una alícuota de  $5 \text{ ml}$  de orina y se diluye con agua hasta  $25 \text{ ml}$  en un matraz aforado. Se toman  $25 \mu\text{l}$  de esta disolución, se añaden  $5 \text{ ml}$  de tampón de fosfato de  $\text{pH } 6$  y se diluye con agua hasta  $25 \text{ ml}$  en un matraz aforado. Se registran los voltamperogramas de la solución así obtenida de acuerdo con el procedimiento previamente descrito para la determinación de cefminox por CAdSV (Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetry). Los voltamperogramas correspondientes a muestras preparadas de esta forma pero que no contienen cefminox no muestran señal que pudiese interferir en la determinación, tal como puede apreciarse en la 5.9.

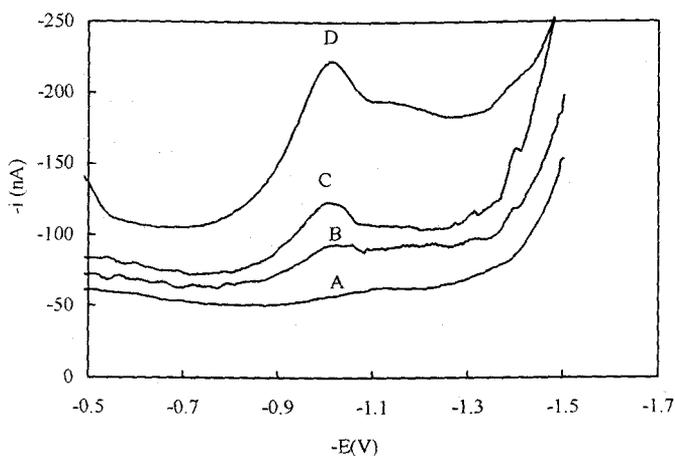


Figura 5.9 Voltamogramas de cefminox en orina  
(A: blanco, B:  $10^{-8}$  M; C:  $10^{-7}$  M; D:  $5 \cdot 10^{-7}$  M)

### 5.11.2. Determinación en muestras de orina dopadas

Se procedió a la determinación de cefminox en muestras sintéticas, preparadas dopando un “pull” de orinas para obtener unas concentraciones de cefminox de  $1000 \text{ mg.l}^{-1}$  y  $2500 \text{ mg.l}^{-1}$ . De las muestras tratadas y medidas con el procedimiento previamente descrito se obtuvieron los resultados que aparecen en la tabla 5.6, que muestran excelentes recuperaciones.

Se estudió, asimismo, la precisión interdías para muestras preparadas de la misma forma, en 5 días distintos, obteniéndose unos valores de  $1010 \pm 9$  y  $2489 \pm 32 \text{ mg.l}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabla 5.6** Análisis de muestras de orina dopadas con cefminox mediante CAdSV.

Concentración añadida (mg.l <sup>-1</sup> )	Concentración calculada <sup>(*)</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )
1000	1004 ± 7
2500	2501 ± 5

<sup>(\*)</sup>Media ± s para 5 determinaciones.

### 5.11.3. Análisis de cefminox en muestras reales de orina

Se administró una única dosis de 2 g de TENCEF<sup>®</sup> (cefminox) a dos voluntarios, se recogieron muestras de orina a diferentes intervalos de tiempo y se procedió a la determinación de cefminox de acuerdo con el procedimiento previamente descrito. Debido a que el volumen de orina es variable, los resultados obtenidos se expresaron respecto a un volumen “normalizado” de 200 ml, a fin de comparar las cantidades excretadas por ambos voluntarios.

Las muestras fueron también medidas, tras un pretratamiento de extracción, mediante un procedimiento cromatográfico [41] empleando una columna Nucleosil C18 de 5 µm de diámetro de partícula y 150 mm de longitud, una mezcla 97:3 de tampón de fosfato de pH 6 y acetonitrilo como fase móvil y detección fotométrica a 272 nm.

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 5.7, y se observa una muy buena concordancia entre los resultados obtenidos por CAdSV y las correspondientes determinaciones mediante HPLC, contrastada estadísticamente mediante la aplicación del ensayo t para comparar dos medias experimentales y el ensayo F de dos colas para la comparación de la precisión.

Los porcentajes de cefminox excretados son plenamente comparables a los obtenidos por otros autores [34,36,79].

**Tabla 5.7** Análisis por CAdSV de muestras reales de orina tras la administración de 2 g de cefminox.

Tiempo (h)	CAdSV			HPLC
	Contenido <sup>(a)</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	F <sub>test</sub>	t <sub>test</sub>	Contenido <sup>(a)</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )
1	2518±31	4.27	0.30	2512±15
	2481±25	3.70	0.25	2485±13
3	3492±23	3.67	0.87	3505±12
	3548±31	11.86	1.50	3520±9
5	1560±20	1.23	0.39	1566±18
	1460±41	26.26	0.33	1452±8
12	942±15	1.86	0.84	951±11
	792±6	4.00	2.32	783±3
		39.00 <sup>b</sup>	2.78 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup>Media de tres determinaciones ± desviación estándar.

<sup>b</sup>Valores críticos para F y t (p = 0.05).

**VI. DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA  
DEL IMIPENEM POR  
VOLTAMPEROMETRÍA DE  
REDISOLUCIÓN ADSORTIVA CATÓDICA**

En este capítulo se describe el estudio de la adsorción y posterior reducción de imipenem adsorbido en el electrodo de gota de mercurio suspendida (HMDE), hecho que va a permitir poner a punto un método analítico de determinación de dicho compuesto utilizando voltamperometría de redisolución catódica de barrido lineal (CAdSLSV), así su determinación en fluidos biológicos.

## 6.1. ESTUDIO PREVIO DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM

En una serie de estudios previos se pudo comprobar que la técnica más adecuada en la etapa de medida es la voltamperometría de barrido lineal. En la figura 6.1 se representa el voltamograma correspondiente a la voltamperometría de barrido lineal perteneciente a una muestra  $10^{-8}$  M de imipenem, 5 ml de tampón fosfato 0.1 M de pH 7.0 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Una vez preparada la muestra, se trasvasó a la celda polarográfica donde se le pasó nitrógeno durante 10 minutos, tras lo cual se dispusieron las condiciones necesarias para la medida y registro de los voltamogramas. El barrido se realizó desde 0 hasta  $-1.0$  V, utilizándose un potencial de acumulación de 0 V, un tiempo de deposición de 120 s y un tiempo de reposo de 15 s.

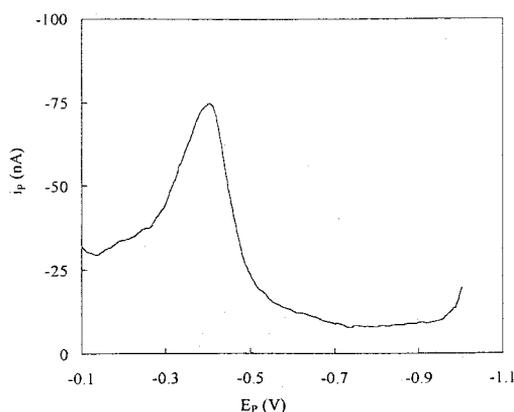


Figura 6.1 Voltamograma de barrido lineal de la forma imina del imipenem  $10^{-8}$  M a pH 7.

Como puede observarse aparece una onda de reducción a un potencial de  $-0.40$  V.

## 6.2. INFLUENCIA DEL pH

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones acuosas de distintos valores de pH entre 6 y 8, añadiendo volúmenes variables de ácido fosfórico 1 M e hidróxido sódico 1 M hasta un volumen total de 5 ml. La concentración de la forma imina del imipenem, las disoluciones de 25 ml fueron  $10^{-8}$  M. Posteriormente se registraron los correspondientes voltamogramas entre 0 y  $-1.0$  V, utilizando un potencial de acumulación de 0 V, un tiempo de deposición de 120 s, un tiempo de reposo de 15 s y una velocidad de barrido de  $300$   $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

En la tabla 6.1, se recogen los valores de la intensidad y del potencial de pico obtenidos a diferentes valores de pH. Se elige como pH óptimo 7.0, ya que la intensidad máxima corresponde a dicho pH, y los picos están bien definidos y la línea base está bien establecida.

**Tabla 6.1** Efecto del pH en la intensidad y potencial de pico mediante voltametría de barrido lineal.

pH	$-i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
6.0	12.23	0.38
6.3	19.31	0.38
6.5	25.17	0.38
6.8	38.45	0.39
7.0	55.45	0.39
7.5	36.58	0.39
8.0	5.23	0.40

### 6.3. INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN

Se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de concentración  $10^{-8}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 7.0 y agua hasta el enrase. Las muestras así preparadas se llevaron a la celda polarográfica termostaticada, donde se pasó nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los correspondientes polarogramas entre 0 y  $-1.0$  V mediante la técnica CAdSV de barrido lineal, variando el potencial de acumulación entre  $-0.6$  y  $0.2$ , y manteniendo el tiempo de deposición en 120 s y el tiempo de reposo en 15 s.

En la tabla 6.2 aparecen los valores correspondientes a la intensidad de pico y los correspondientes valores de potencial de acumulación.

**Tabla 6.2** Variación de la intensidad de pico con el potencial de acumulación.

$-E_{ac}(V)$	$-i_p(nA)$
-0.60	1.38
-0.40	2.67
-0.20	3.78
-0.10	6.90
-0.05	17.10
-0.03	32.90
0.01	41.68
0.10	66.17
0.20	92.21

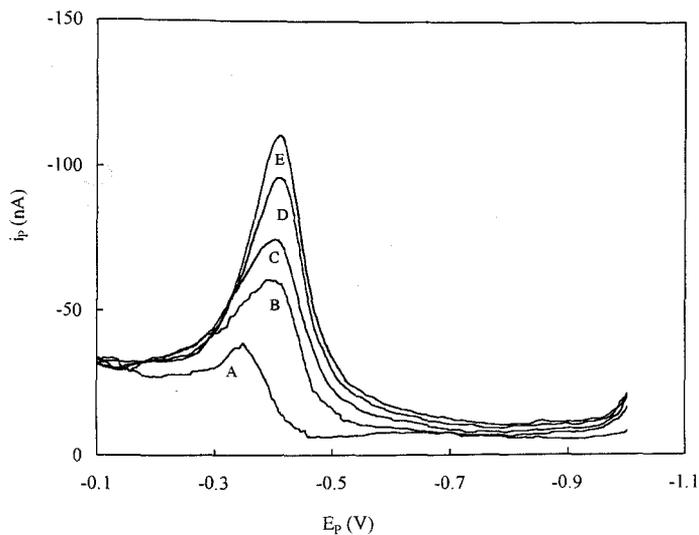
Como puede observarse, la intensidad de pico va creciendo en función del potencial de acumulación. Por ello se elige un potencial de deposición de 0 V para estudios posteriores.

#### 6.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE DEPOSICIÓN

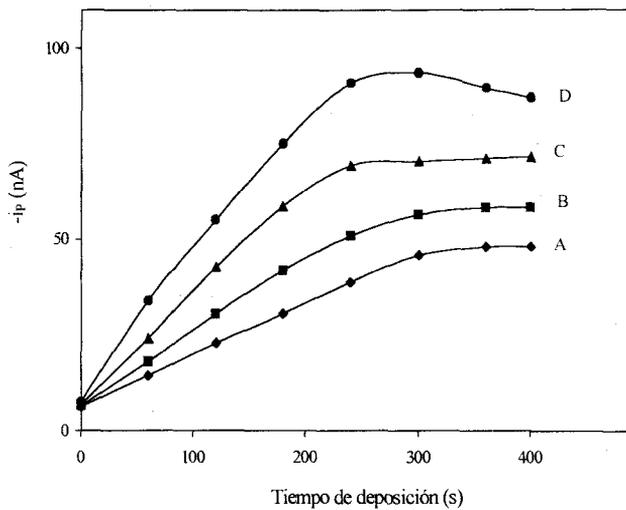
En la técnica de stripping o redisolución, el tiempo de deposición es un parámetro clave a la hora de obtener respuestas sensibles y reproducibles, generalmente, la intensidad de la señal de redisolución debe crecer con el aumento del tiempo de preelectrólisis, hasta que se alcanza un límite de saturación de la gota.

Para realizar el estudio de este parámetro, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones entre  $10^{-10}$  y  $4 \cdot 10^{-8}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 7 y se registraron los voltamogramas correspondientes entre 0 y  $-1.0$  V, variando el tiempo de deposición entre 0 y 360 s según la concentración, y manteniendo el potencial de acumulación en 0 V y el tiempo de reposo en 15 s. En la figura 6.2 se representan los voltamogramas de una disolución de imipenem  $10^{-8}$  M a distintos tiempos de deposición.

En la figura 6.3 se representan los valores de la intensidad de pico frente al tiempo de deposición, para diferentes concentraciones de imipenem. Se observa que para cada concentración existe una zona de aumento lineal de la intensidad de pico con el tiempo de deposición, y una zona en la cual se pierde esta linealidad debido a la saturación de la gota de mercurio. Se elige como tiempo de deposición óptimo 120 s.



**Figura 6.2** Voltamogramas de la forma imina del imipenem  $10^{-8}$  M al variar el tiempo de deposición. (A: 0 s; B: 60 s; C: 120 s; D: 180 s; E: 240 s.)



**Figura 6.3** Influencia del tiempo de deposición sobre la intensidad de pico de la forma imina del imipenem (A:  $10^{-10}$  M; B:  $10^{-9}$  M; C:  $6 \cdot 10^{-9}$  M; D:  $10^{-8}$  M)

## 6.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REPOSO

Para estudiar la influencia del tiempo de reposo se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de imipenem de concentración  $10^{-8}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 7 y se registraron los voltamogramas correspondientes entre 0 y  $-1$  V, variando el tiempo de reposo entre 10 y 40 s, y manteniendo el potencial de acumulación en 0 V y el tiempo de deposición a 120 s.

Los valores correspondientes a la variación del tiempo de reposo con respecto a la intensidad y potencial de pico, se encuentran en la tabla 6.3. Se observa, que en el rango estudiado, no existen grandes variaciones con respecto al potencial de pico. Para estudios posteriores se elige 15 s como tiempo de reposo.

**Tabla 6.3** Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación del tiempo de reposo de la forma imina del imipenem  $10^{-8}$  M

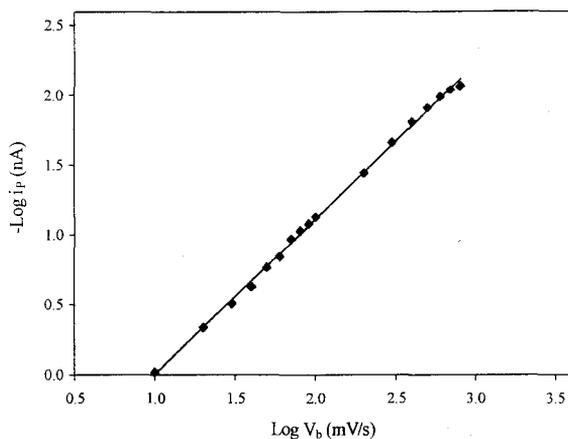
Tiempo de equilibrado (s)	$-i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
10	54.87	0.405
15	55.61	0.403
20	55.76	0.398
30	56.45	0.402
40	55.38	0.412

## 6.6. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO

Para estudiar la influencia de la velocidad de barrido se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones acuosas de imipenem de una concentración de

$10^{-8}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 7 y se registraron los voltamogramas correspondientes entre 0 y -1 V, variando la velocidad de barrido entre 10 y 900  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , y manteniendo el potencial de acumulación en un valor de 0 V, el tiempo de deposición en 120 s y el tiempo de reposo en 15 s.

En la tabla 6.4, se encuentran recogidos los valores correspondientes a la variación del log de  $V_b$  con respecto a la intensidad y potencial de pico, y en las figuras 6.4 y 6.5 se representan el log de  $i_p$  y el potencial de pico frente al log de  $V_b$  respectivamente. Como puede apreciarse, a medida que aumenta la velocidad de barrido aumenta la intensidad y el potencial de pico de forma lineal, con coeficientes de correlación de 0.997 y 0.996, respectivamente. Para estudios posteriores se elige una velocidad de barrido de 300  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Figura 6.4** Variación del log  $i_p$  con el log  $V_b$

**Tabla 6.4** Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación de la velocidad de barrido de la forma imina del imipenem  $10^{-8}$  M.

$V_b$ (mV·s <sup>-1</sup> )	Log $V_b$ (mV·s <sup>-1</sup> )	$-i_p$ (nA)	$-\log i_p$ (nA)	-E (V)
10	1.00	1.044	0.02	0.347
20	1.30	2.161	0.33	0.353
30	1.48	3.206	0.51	0.358
40	1.60	3.609	0.56	0.360
50	1.70	5.008	0.70	0.363
60	1.78	7.087	0.85	0.365
70	1.85	7.961	0.90	0.365
80	1.90	8.009	0.90	0.366
90	1.95	8.932	0.95	0.370
100	2.00	9.863	0.99	0.370
200	2.30	27.700	1.44	0.375
300	2.48	45.500	1.66	0.379
400	2.60	64.001	1.81	0.383
500	2.70	81.003	1.91	0.386
600	2.78	97.270	1.99	0.378
700	2.85	109.200	2.04	0.378
800	2.90	115.300	2.06	0.388
900	2.95	119.450	2.08	0.388

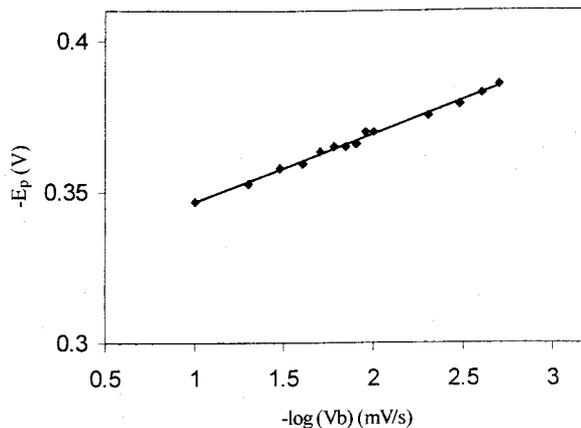
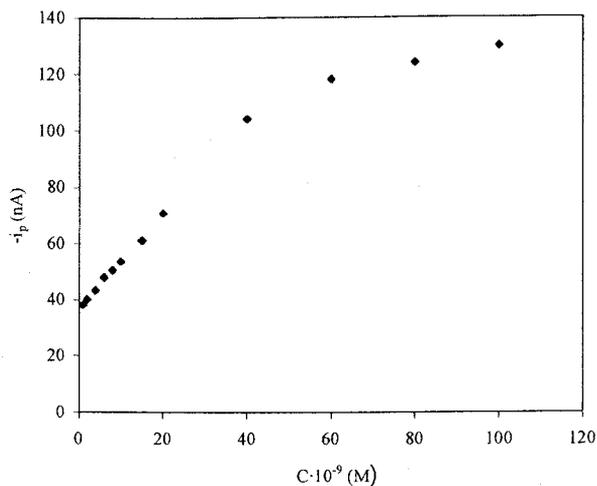


Figura 6.5 Variación de  $-E_p$  con el  $\log V_b$

### 6.7. RECTA DE CALIBRADO

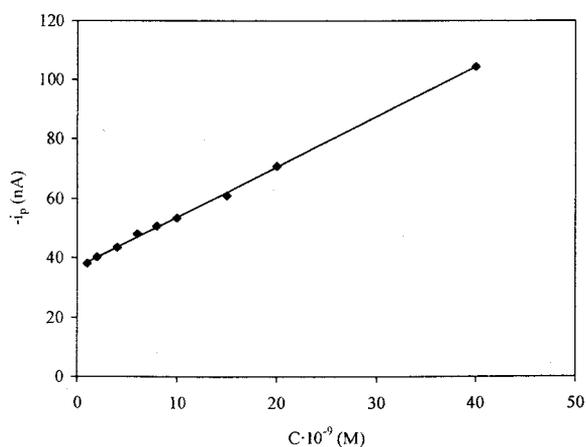
Una vez optimizados los parámetros instrumentales propios de la técnica utilizada se procedió al establecimiento de una recta de calibrado en las condiciones anteriormente fijadas ( $E_{ac}$  0 V, tiempo de acumulación de 120 s, tiempo de reposo de 15 s y velocidad de barrido de  $0.3 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Para ello se prepararon muestras, en matraces de 25 ml, conteniendo la forma imina de imipenem de distintas concentraciones entre  $10^{-9}$  y  $10^{-7}$  M y 5 ml de tampón fosfato de pH 7.0. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda polarográfica donde se desoxigenan pasando nitrógeno durante 10 minutos, registrándose los correspondientes voltamogramas entre 0 y  $-1$  V.

En la figura 6.6 se muestra la relación existente entre la concentración de imipenem y la intensidad de pico.



**Figura 6.6** Variación de la intensidad de pico con la concentración de imipenem

En el rango de concentraciones estudiado existe una relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración entre  $10^{-9}$  y  $4 \cdot 10^{-8}$  M, por lo que el calibrado se realiza para este rango de concentraciones. En la figura 6.7 se muestra la recta de calibrado obtenida a partir de triplicados preparados y medidos de la misma forma que en el párrafo anterior.



**Figura 6.7** Recta de calibrado de la forma imina del imipenem

La expresión de la ecuación de la recta obtenida tras el ajuste por mínimos cuadrados es la siguiente:

$$-\Delta i_{max} = (36.84 \pm 0.28) + (1.69 \pm 0.017) C \quad , r = 0.9993$$

donde  $-\Delta i_{max}$  se expresa en nA y C en  $10^{-9}$  M.

## 6.8. REPETITIVIDAD

Para conocer la repetitividad del método propuesto se prepararon en matraces de 25 ml 11 muestras iguales de concentración de forma imina de imipenem  $10^{-8}$  M y 5 ml de tampón fosfato de pH 7, registrándose los correspondientes voltamogramas como en apartados anteriores y obteniéndose los valores de intensidad. Los parámetros estadísticos, valor medio de la señal ( $y_m$ ); desviación estándar (s); y desviación estándar relativa (%E) se recogen en la tabla 6.5, y fueron calculados de acuerdo a las expresiones del apartado 3.13.

**Tabla 6.5** Repetitibilidad. Cálculo de parámetros estadísticos.

	Concentración $10^{-8}$ M
$y_m$ (nA)	55.91
s (nA)	2.57
%E	4.60

## 6.9. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se calculó el límite de detección ( $X_{LOD}$ ) y el límite de cuantificación ( $X_{LOQ}$ ) a partir de la recta de calibrado obtenida en el apartado 5.7. Los valores de intensidad de pico correspondientes al límite de detección ( $y_{LOD}$ ) y cuantificación

( $y_{LOQ}$ ) se calculan a partir del valor de la desviación estándar de la señal del blanco, que viene dada por la siguiente expresión:

$$S_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

donde  $y_i$  son los valores de la intensidad de pico obtenidos para cada concentración,  $\hat{y}_i$  son los valores de intensidad de pico calculados a partir de la recta de regresión y  $n$  es el tamaño muestral [119],

$$y_{LOD} = a + 3 S_B$$

$$x_{LOD} = (y_{LOD} - a)/b$$

$$y_{LOQ} = a + 10 S_B$$

$$x_{LOQ} = (y_{LOQ} - a)/b$$

donde  $a$  es la ordenada en el origen y  $b$  la pendiente de la recta de calibrado. Con estos datos se obtiene un límite de detección de  $1.05 \cdot 10^{-9}$  M y un límite de cuantificación de  $3.62 \cdot 10^{-9}$  M.

## 6.10. PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FORMA IMINA DEL IMPENEM

En matraces de 25 ml se pone una cantidad de forma imina de imipenem correspondiente a entre 0.03 y 0.30  $\mu\text{g}$  de imipenem se añaden 5 ml de tampón fosfato de pH 7 y se enrasa con agua desionizada. Las muestras se colocan en una celda polarográfica, registrándose los correspondientes voltamogramas, entre 0 y -1 V después de desoxigenar durante 10 minutos con una corriente de nitrógeno puro, frente al electrodo de gota de mercurio suspendida (HMDE) mediante la

técnica de voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica de barrido lineal (CAdSLSV). Los voltamogramas se registran fijando una velocidad de barrido en  $300 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , el potencial de preconcentración en  $0 \text{ V}$ , el tiempo de acumulación en  $120 \text{ s}$  y el tiempo de reposo en  $15 \text{ s}$ . Por comparación con la correspondiente recta de calibrado, obtenida en iguales condiciones se determina la concentración de la forma imina del imipenem.

## **6.11. DETERMINACIÓN DE IMPENEM EN PREPARACIONES FARMACÉUTICAS**

Previamente a la determinación, se procedió a comprobar si la cilastatina podría interferir en la misma, ya que todas las preparaciones farmacéuticas de imipenem contienen dicho compuesto en la misma proporción en peso ya que su coadministración inhibe la degradación por efecto de las dehidropeptidasas del organismo. Se comprueba que cantidades de cilastatina hasta 10 veces mayores a las de imipenem no producen interferencia en la determinación del mismo a través de su forma imina. Asimismo, la presencia de cilastatina no modifica, en modo alguno, la degradación química del imipenem en solución acuosa hacia la forma imina.

Se analizaron por triplicado 3 muestras de cada una de las formulaciones farmacéuticas que contienen imipenem presentes en el mercado. TIENAM<sup>®</sup> 250/250 mg y TIENAM<sup>®</sup> 500/500 mg.

Para ello, se disolvió el preparado en agua destilada y se tomaron las alícuotas necesarias para su determinación CAdSV tras una espera de aproximadamente 2 horas, a fin de garantizar la degradación completa del imipenem a su forma imina.

El imipenem presente en las preparaciones fue también determinado mediante un procedimiento por HPLC [59].

Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 6.6, apreciándose una muy buena concordancia entre los resultados obtenidos por CAdSV y las correspondientes determinaciones mediante HPLC, contrastado estadísticamente mediante la aplicación del ensayo t para comparar dos medias experimentales y el ensayo F de dos colas para la comparación de la precisión.

Tabla 6.6 Análisis de imipenem en preparaciones farmacéuticas.

	CAdSV			HPLC
	Calculado <sup>(a)</sup>	F <sub>test</sub>	t <sub>test</sub>	Calculado <sup>(a)</sup>
TIENAM <sup>®</sup> 250/250 mg	248 ± 8	3.28	0.28	248 ± 5
	255 ± 6	4.21	0.31	247 ± 7
	249 ± 5	3.40	0.15	251 ± 8
TIENAM <sup>®</sup> 500/500 mg	497 ± 5	1.39	0.22	512 ± 6
	515 ± 6	3.80	0.25	522 ± 8
	523 ± 5	1.93	0.23	519 ± 9
		39.00 <sup>(b)</sup>	2.78 <sup>(b)</sup>	

<sup>(a)</sup>Media de tres determinaciones ± desviación estándar

<sup>(b)</sup>Valores críticos para F y t (p = 0.05)

## **CONCLUSIONES**

Del estudio realizado sobre cefminox e imipenem que se resumen en la presente Memoria, caben destacar los aspectos que se recogen en las siguientes conclusiones:

1. Se estudia el comportamiento electroquímico de cefminox mediante polarografía diferencial de impulso y tast, estudiando la influencia del tiempo de gota de mercurio, influencia del pH sobre el potencial y la intensidad de impulso. Así mismo se estudia la influencia de la temperatura, velocidad de barrido y amplitud de impulso, Se estudia también la naturaleza del proceso de reducción mediante polarografía diferencial de impulso, tast y voltamperometría cíclica, resultando ser un proceso irreversible.
2. Se calcula el número de protones y electrones que intervienen en el proceso de reducción, proponiéndose el mecanismo de reducción del cefminox.
3. Se propone un método polarográfico para la determinación de cefminox, aplicable a un intervalo comprendido entre 3.14-32.5 mg.l<sup>-1</sup>, que posee una reproducibilidad de 3.7% y una concentración de 5.416 mg.l<sup>-1</sup>; y 3.3% y una concentración de 27.08 mg.l<sup>-1</sup>. El límite de detección es de 0.95 mg.l<sup>-1</sup> y un límite de cuantificación de 3.14 mg.l<sup>-1</sup>. Este método es aplicado para la determinación de dicho fármaco en orina, obteniendo buenos resultados.
4. Se estudia el comportamiento electroquímico de la forma imina del imipenem mediante polarografía diferencial de impulso y tast, estudiando la influencia del tiempo de goteo, del pH sobre el potencial y la intensidad de impulso. Así mismo se estudia la influencia de la temperatura, velocidad de barrido y amplitud de impulso, Se estudia la naturaleza del proceso de reducción

mediante polarografía diferencial de impulso, tast y voltamperometría cíclica, resultando ser un proceso irreversible.

5. Se calcula el número de protones y electrones que intervienen en el proceso de reducción, proponiéndose el mecanismo de reducción de imipenem.
6. Se propone un método polarográfico para la determinación de la forma imina del imipenem, aplicable a un intervalo comprendido entre 0.299-29.934 mg.l<sup>-1</sup>, que posee una reproducibilidad de 2.47% y una concentración de 2.99 mg.l<sup>-1</sup>; y 2.8% y una concentración de 29.93 mg.l<sup>-1</sup>. El límite de detección es de 4.5.10<sup>-7</sup> M y un límite de cuantificación de 1.5.10<sup>-6</sup> M. Este método es aplicado para la determinación de dicho fármaco en orina, obteniendo buenos resultados.
7. Se estudia el comportamiento electroquímico de cefminox mediante voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica de barrido lineal, estudiando la influencia del tiempo de preconcentración, del pH sobre el potencial y la intensidad de adsorción, el potencial de acumulación, el tiempo de reposo y la velocidad de barrido.
8. Se propone un método voltamperométrico para la determinación de cefminox, aplicable a un intervalo comprendido entre 1.12-20.31 µg, que posee una reproducibilidad de 4.32% y una concentración de 10<sup>-7</sup>M. El límite de detección es de 2.47.10<sup>-8</sup> M y un límite de cuantificación de 8.25.10<sup>-8</sup> M. Este método es aplicado para la determinación de dicho fármaco en orina, obteniendo buenos resultados.

9. Se estudia el comportamiento electroquímico de imipenem mediante voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica de barrido lineal, estudiando la influencia del tiempo de preconcentración, del pH sobre el potencial y la intensidad de adsorción, el potencial de acumulación, el tiempo de reposo y la velocidad de barrido.
  
10. Se propone un método voltamperométrico para la determinación de imipenem, aplicable a un intervalo comprendido entre 0.30-11.97  $\mu\text{g}$ , que posee una reproducibilidad de 4.60% a una concentración de  $10^{-8}\text{M}$ . El límite de detección es de  $1.05 \cdot 10^{-9}\text{ M}$  y un límite de cuantificación de  $3.62 \cdot 10^{-9}\text{ M}$ . Este método es aplicado para la determinación de dicho fármaco en orina, obteniendo buenos resultados.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1- JACOBY, G; MEDEIROS, A.A; "More extended-spectrum betalactamases", *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (1991) 1697-704.
- 2- SANDERS, C.C; SANDERS, W.E J.R; "betalactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact.", *Clin infect Dis*. (15) (1992) 824-39.
- 3- FRAIMOW, H.S; ABRUTIN, E; "Pathogens resistant to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management.", *Clin Infect Dis*, (9) (1995) 497-30.
- 4- HESSEN, M.T; KAYE, D; "Principles of selection and use of antibacterial agents.", *Clin Infect Dis*, (9) (1995) 531-45.
- 5- MASHAL, W.F; BLAIR, J.E; "The cephalosporins", *Mayo Clin Pro*, (74) (1999) 187-195.
- 6- GIVNER, L.B; KAPLAN, S.L; "Meningitis due to *Staphylococcus aureus* in children", *Clin Infect Dis*, (16) (1993) 766-71.
- 7- BRADLEY, J.S; KAPLAN, S.L; KLUGMAN, K.P; LEGGIADRO, R.J; CONSENSUS; "management of infections in children caused by *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibility to penicillin", *Pediatr Infect Dis J*, (14) (1995) 1037-41.
- 8- MOOSDEEN, F; "The evolution of resistance to cephalosporins", *Clin Infect Dis*, (24) (1997) 487-93.
- 9- HUGHES, W.T; AMSTRONG, D; BODEY, G.P; *et al.* "1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever", *Infectious Diseases Society of America*, "Fever and Neutropenia Guideline Panel, *Infectious Diseases*", Society of America Alexandria Virginia USA. *Clin Infect Dis*, (25) (1997) 551-73.
- 10- BARRADELL, L.B; BRYSON, H.M; "Cefepime, A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*", (47) (1994) 471-505.

- 11- KARCHMER, A.W; "principles and Practice of Infectious Diseases", 4 th edition. New York Churchill Livingstone, (1995) 247-64.
- 12- KIEFT, H; HOEPELMAN, A.L; "ROZENBERG-ARSKA MET A.L "Cefepime compared with ceftazidime as initial therapy for serious bacterial infections and sepsis syndrome", *Antimicrob Agents Chemother*, (38) (1994) 415-21.
- 13- SANDERS, C.C; "Cefepime: the next generation?", *Clin Infect Dis*. (17)(1993) 369-79.
- 14- KASAI, T; MARA, T; TAMURA, A; *et al*. "In vitro and in vivo activities of a novel cepahmycin, cefminox, against the bacteroides fragillis group in comparison with six cephem antibiotics", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (15) (1985) 701-14.
- 15- TSUROUKA. YAMADA, Y; GOI, H; *et al*. "The bacteriolytic action of cefminox, a new cephamycin antibiotic on Gram-negative bacteria", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (15) 1985 159-171.
- 16- SAKAI, K; FUJIMOTO, M; UEDA, T; *et al*. "Estudio de cefminox en cirugía", *Chemotherapy*, (32) (1984) 370-377.
- 17- WASHIDA, H; TSUGATANIA, M; HIRAO, N; *et al*. "Estudio clínico de cefminox en infecciones complicadas del tracto urinario", *Journal of New Remedies and Clinics*, (33) (1984) 1711-1715.
- 18- ISHIYAMA, S; *et al*. "Studies on cefoxitin:Antibacterial Activity, Absortion, Excretion, Metabolism.Tissue Distribution and Clinical Application in Surgery", *Chemotherapy*, (26) 1978 389-399.
- 19- NAKAMURA, T; HASHIMOTO, F; SAWADA, Y; *et al*. "Investigación Clínica de Cefminox administrado por vía I.V", *Chemotherapy*, (32) (1984) 303-314.

- 20- NAKAYAMI, I; MASHIMO, K; "Estudio clínico de un nuevo antibiótico, Cefminox, en infecciones quirúrgicas", St, Fransican Tenhi Hospital, Nihon University *et al.*
- 21- KIDA, K.M; HAYASHI, M; KAINO, K; *et al.* "Estudio clínico de Cefminox en el campo pediátrico", The Japanese Journal of Antibiotics, (38) (1985) 751-758.
- 22- KANETO, H; TERASAKI, T; YURI, K; *et al.* "Evaluación clínica de Cefminox en infecciones genito-urinarias", Dept. Urology Kyoto Prefectural University of Medicine, (1985).
- 23- MIYATA, K; FURAKAWA, M; OKIMURE, M; *et al.* "Ensayo clínico de cefminox en Urología", Chemotherapy, (32) (1984) 370-377.
- 24- MIYAMOTO, S; TAMIYA, T; TAKATSUKA, K; *et al.* "Estudio de Cefminox sobre infecciones agudas del tracto urinario", Sangawa City Medical Center and Sapporo Medical College. Drugs Exp. Clin. Res, (11) (1985) 379-82.
- 25- MIYAMOTO, S; TAMIYA, T; TAKATSUKA, K; *et al.* "Comparison of rapid bacteriological response to Cefminox and Latamoxef in complicated urinary tract infections. Drugs Exp. Clin. Res, (11) (1985) 383-85.
- 26- KUMAZAWA, J; MASHIMO, K; "Estudio clínico de Cefminox en infecciones urinarias", Sapporo Medical College, Faculty of Medicine of Tokyo *et al.*
- 27- KUMAZAWA, J; KUMAMOTO, Y; NIIJIMA, T; *et al.* "Estudio comparativo de la eficacia del Cefminox y Cefotaxima en el tratamiento de infecciones urinarias complicadas", The Nishinohon Journal of Urology, (46) (1984) 491-1516.
- 28- OHKOSHI, M; KAWAMURA, N; "Criteria for evaluation of YTI", (1ª ed.) Chemotherapy, (28) 1980 321-41.

- 29- ARAKAWA, S; TADERA, S; SHIMISU, T; *et al.* "Fundamental and clinical studies of Cefminox in the urological field", *Chemotherapy*, (32) (1984) 444-53.
- 30- SORIANO, F; EDWARDS, R; GREENWOOD, D; "Comparative susceptibility of Cefminox and Cefoxitin to betalactamases of *Bacteroides* spp", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (28) (1991) 55-60.
- 31- OTAYA, H; OZAWA, A; GOTO, J; "Mode of action of chemotherapeutic agents against growing bacterial", 9<sup>th</sup> international Congress *Chemotherapy*, (3) (1975) 10-205.
- 32- MATSUHASHI, M; TSUROUKA, T; "Mode of action Cefminox", *Chemotherapy*, (32 S-5) (1984) 11-16.
- 33- INOUE, S; GOI, H; WATANABE, T; *et al.* "In vitro and in vivo antibacterial activities of Cefminox, a new semisynthetic cephamycin, compared with those of five cephalosporins", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (26) 1984 722-9.
- 34- TOMONO, N; CHIBA, F; SAKURAI, T; *et al.* "Pharmacokinetic of Cefminox-serum levels and urinary excretions", *Chemotherapy*, (32 S-5) (1984) 67-75.
- 35- NAKAWAGA, K; KOYAMA, M; MIYAZAKI M; *et al.* "Phase I. Clinical study of Cefminox", *Chemotherapy*, (32) (1975) 205-10.
- 36- KOMIYA, I; NISHIO, M; MURATA, S; *et al.* "A novel method to predict the elimination half-lives and the renal excretion mechanisms of cephalosporins", *J. Pharm. Dyn.*, (7) (1984) 545-555.
- 37- TOMONO, N; "Pharmacokinetics of Cefminox. Distribution in tissues", *Chemotherapy*, (32 S-5) (1984) 76-80.
- 38- KAMIYA, I; ISHIZUKA, T; NISHIO, M; *et al.* "Distibution, Metabolism and Excretion of <sup>14</sup>C-Cefminox in rats (II). Distribution and excretion after multiple intravenous administrations in male rats and after a single

- intravenous administration in female rats”, *Jap. J. Antibiotics*, 37 (5) (1984) 938-949.
- 39- KAWAGUCHI, H; NAKAYAMA, I; AKIEDA, Y; *et al.* “Comparative pharmacokinetic study of Cephamicin, antibiotic, Cefminox, Cefoxitin, Cefmetazole and Cefbuperazone”, 13 th international Congress of Chemotherapy, (1983).
- 40- NAKAGAWA, K; SAITO, A; MASHIMO, K; “Human Pharmacokinetics of Cefminox, a new cephamycin antibiotic, after parenteral administration”, 13 the international Congress of Chemotherapy, (1983).
- 41- GARCIA, GLEZ; MENDEZ, J.C; MARTIN. VILLACORTA, R; “Quantitative determination of semisynthetic cephamycins in human serum and urine by ion-exchange, reversed-phase and ion-pair chromatography”, *J. Dept Física Quim. Y E.G. Fac. Biol e Vet. Univ. Leon 24071 Leon Spain. J. Chromatogr. A* 3 Jul, 812 (1-2) (1998) 197-204.
- 42- WU, Z. J.; ZHANG, Q.G.; NI, K. Y; LIN, Y. S. XIAMEN; “Studies on the simultaneous measurement of several cephalosporins by reversed-phase HPLC”, *Inst. Drug Control, Xiamen 361012, China. Sepu, Nov, 17(6) (1999) 518-521.*
- 43- ZHU, S. Q; NI, K. Y; W.U, Z. J; L.I, Z; ZHANG, Q. G; “Application of correspondence analysis to fractional experiment for analysis of cephalosporin with reversed-phase HPLC”, *China Pharm. Univ. , Nanjing 210009, China. Fenxi Huaxue, 29(4) (Apr 2001) 457-460.*
- 44- HELLINGER, W.C; BREWER, N.S; “Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem and aztreonam”, *Mayo Clin Proc, (74) (1999) 420-434.*
- 45- PEDERZOLI, P; BASSI, C; VESENTIN, S; CAMPEDELLI, A; “A randomized multicenter Clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic

- complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem", *Surg Gynecol Obstet*, (176) (1993) 480-483.
- 46- CRAIG, W.A; "The pharmacology of meropenem: a new carbapenem antibiotic", *Clin Infect Dis* 24 (Suppl 2) (1997) S266-S275
- 47- KAHAN. JS; KAHAN FM, GOEGLEMAN. R; *et al.* "Thienamycin, a new betalactam antibiotic. 1. Discovery, isolation and physical properties", *J. Antibiot*, (32) (1979) 1-12.
- 48- TALLY, F.P; JACOBUS, N.V; GORBACH, S.L; "In vitro activity of thienamycin", *Antimicrob Agents Chemother*; (14) (1978) 436-438.
- 49- MOELLERING, R.C; ELIOPOULOS; SENTOCHNIK, D.E; "The carbapenems: new broad spectrum betalactam antibiotics", *J. Antimicrob. Chemother*, 24(Suppl A) (1989) 1-7.
- 50- ZAC, O; LANG, M; COZENS, R; *et al.* "Penems: in vitro and in vivo experiments", *J. Clin. Pharmacol*, (28) (1988) 128-135.
- 51- CHAMBERS, H.F; NEU, H.C; "Other betalactam antibiotics", EN, MANDELL, G.L; BENNTT, J.E. Y; DOLIN, R. EDS; "Principles and practice of Infectious Diseases", New York Churchill Livingstone, (1995) 264-272.
- 52- NIKAIDO, H; "Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance", *Antimicrob Agents Chemother*, (33) (1989) 183-1836.
- 53- WISE, R; "In vitro and pharmacokinetic properties for the carbapenems", *Antimicrob Agents Chemother*, (30) (1986) 343-349.
- 54- NORRBY, S.R; "Carbapenémicos", *Clin Med NorTEAM*, (4) (1995) 731-743.
- 55- BALFOUR, J.A; BRYSON, H.M. 6 B. ROGDEN, R.N; "Imipenem/Cilastatin. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the treatment of serious infections", *Drugs* , (51) (1996) 99-136.

- 56- FISH, D.N; SINGLETARY, T.J; "Meropenem, a new carbapenem antibiotic", *Pharmacotherapy*, (17) (1997) 644-669.
- 57- WISEMAN, L.R; WAGSTAFF, A.J; BROGDEN, R.N; BRYSON, H.M; "Meropenem: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy", *Drugs*, (50) (1995) 701-730.
- 58- GEORGE, B. SMITH; E.F. SCHOENEWALDT; "Stability of N-Formimidoylthienamycin in aqueous solution.", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (70 n°3) (1981) 272-276.
- 59- GRAVALLESE, D.A; MUSSON, D.G., PAULIUKONIS, L.T; BAYNE, W.F; "Determination of imipenem (N-Formimidoyl thienamycin) in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, comparison with microbiological methodology and stability", *Journal of Chromatography*, (310) (1984) 71-84.
- 60- G, CARLUCCI; \*\*P, MAZZEO\*; M, BOLOGNAS; "Imipenem in biological fluids analyzed by derivative UV-spectrophotometry\*", *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, (9) (1991) 1169-1172.
- 61- ALBERTO, PARRA; \* JAVIER, GARCIA.VILLANOVA; VICENTE, RÓDENAS; M, DOLORES.GÓMEZ; "First-and second-derivative spectrophotometric determination of imipenem and cilastatin in injections", *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, (11 n° 6) (1993) 477-482.
- 62- R.J, FORSYTH\*; D.P, I.P; "Determination of imipenem and cilastatin sodium in Primaxin® by first order derivative ultraviolet spectrophotometry", *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, (12 n° 10) (1994) 1243-1248.
- 63- GARCIA.CAPDEVILLA, L; LÓPEZ.CALULL\*, C; ARROYO, C; MORAL, M.A; MANGUES, M.A; BONAL, J; "Determination of imipenem in plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic studies in patients", *Journal of Chromatography B*, (692) (1997) 172-132.

- 64- SHOKO, TANIGUCHI; KENJI, HAMASE; AKIO, KINOSHITA; KIOSHI, ZAITSU; "Simple and rapid analytical method for carbapenems using capillary zone electrophoresis", *Journal of chromatography B*, (727) (1999) 219-225.
- 65- ZUMAN, P; "Organic polarographic analysis", Pergamon press ed. London, (1964) 22-25.
- 66- MEITES, L; "Polarographic Techniques. 2<sup>a</sup> Ed", Interscience Publishers, J. Welly & Sons, Inc, New York, (1965).
- 67- RANDLES, J.E.B; "Trans", *Faraday Soc*, (44) (1948) 327.
- 68- SEVCIK, A; *Collet. Czech. Chem. Commun*, (13) (1948) 349.
- 69- NICHOLSON, R.S; *Am. Chem. Soc*, (79) (1954) 2539.
- 70- DALAHAY, P.J; *Am. Chem. Soc*, (75) (1975) 1190.
- 71- MEITES, L; "Advances in polarographic instrumentation in the United States, in progress in polarography", Zuman, P; Kolthoff, Y.M; editors, Interscience. New York, Vol (2), (1962) 515.
- 72- BIRKE, R.L; MYUNG-HOON, K; STRASSFELD, M; *Ana Chem*, (53) (1981) 852.
- 73- SENGÜN, F.I; GÜRKAN, T; FEDAI, I; SUNGUR, S; *Analyst* (110) (1985) 1111.
- 74- MUÑOZ, E; AVILA, L.L; CAMACHO, L; *J. Electroanal. Chem*, (282) (1990) 189.
- 75- MUÑOZ, E; AVILA, J.L; PÉREZ, J; CAMACHO, L; *Electroanalysis*, (5) (1993) 325 (*Tetrahedron Lett*, (23) 1972) 2341).
- 76- OCHIAI, M; AKI, O; MORINATO, A; OKADA, T; SHINIZAKI, K; ASAHI, Y; *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, (1) (1974) 258.
- 77- OCHIAI, M; AKI, O; MORINATO, A; OKADA, T; SHINIZAKI, K; ASAHI, Y; *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, (1) (1974) 258.

- 78- Miller, J.C; MILLER, J.N; "Statistic for Analytical Chemistry, 3<sup>rd</sup> ed", Ellis Horwood-Prentice Hall, Chichester, (1993).
- 79- NAKAYAMA, I.; Chemotherapy, (32) (1984) 319.
- 80- BERSIER, P; BERSIER, J; SEDELMEIER, G; HUNGERBÜHLER, E; "Polarography of Penem Carbapenem Antibiotics and the Azetidinone Intermediate", Electroanalysis, 2(1990) 373-381.
- 81- ODIPO-OKUMU, D; Chemistry 457, Seminar Class, (<http://sankofa.loc.edu/dharris/web/Denis/carbapenems.htm>).

## **INDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>Figura 3.1</b> La doble capa de Helmholtz en la superficie del electrodo.....	54
<b>Figura 3.2</b> Tipos de dependencia entre la intensidad límite y la concentración de analito en función de la naturaleza del proceso electródico.....	56
<b>Figura 3.3</b> Reducción del cefminox a pH 6 A) Polarografía diferencial de impulso, b) Polarografía tast.....	63
<b>Figura 3.4</b> Polarogramas tast para distintas concentraciones de tritón X-100 (p/v). 1) 0.001%, 2) 0.015%, 3) 0.05%.....	64
<b>Figura 3.5</b> Variación de la intensidad límite con el pH.....	66
<b>Figura 3.6</b> Variación de la intensidad de pico con el pH.....	67
<b>Figura 3.7</b> Variación del potencial de onda media con el pH.....	68
<b>Figura 3.8</b> Variación del potencial de pico con el pH.....	68
<b>Figura 3.9</b> Variación de la intensidad de pico con $t_g^{2/3}$ .....	70
<b>Figura 3.10</b> Variación de la intensidad de pico de reducción del cefminox en función de la amplitud de impulso aplicado.....	73
<b>Figura 3.11</b> Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura..	74
<b>Figura 3.12</b> Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura.....	75
<b>Figura 3.13</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 4.....	77
<b>Figura 3.14</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 6.....	78
<b>Figura 3.15</b> Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke aplicado a la onda de reducción del cefminox.....	80
<b>Figura 3.16</b> Estudio de la reversibilidad mediante voltamperometría cíclica a distintos valores de pH 1) pH 6; 2) pH 4; 3) pH 8.....	81
<b>Figura 3.17</b> Variación de la intensidad de pico con la $V_b^{1/2}$ .....	82
<b>Figura 3.18</b> Variación de intensidad límite con la concentración de cefminox pH 3.14.....	86

<b>Figura 3.19</b> Variación de intensidad límite con la concentración de cefminox pH 6.....	86
<b>Figura 3.20</b> Recta de calibrado del cefminox.....	92
<b>Figura 4.1</b> Reducción polarográfica de la forma imina del imipenem a pH 2. 1) Polarografía tast, 2) Polarografía diferencial de impulso.....	103
<b>Figura 4.2</b> Variación de la intensidad de pico con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem.....	106
<b>Figura 4.3</b> Variación de la intensidad límite con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem.....	106
<b>Figura 4.4</b> Variación del potencial de onda media con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem.....	107
<b>Figura 4.5</b> Variación del potencial de pico con el pH para la onda de reducción de la forma imina del imipenem.....	107
<b>Figura 4.6</b> Variación de la intensidad de pico con $t_g^{2/3}$ .....	110
<b>Figura 4.7</b> Variación de la intensidad de pico de reducción de la forma imina del imipenem en función de la amplitud de impulso aplicado.....	112
<b>Figura 4.8</b> Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura..	113
<b>Figura 4.9</b> Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura.....	114
<b>Figura 4.10</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 2.....	117
<b>Figura 4.11</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial a pH 4.5.....	117
<b>Figura 4.12</b> Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke aplicado a la onda de reducción de imipenem.....	119
<b>Figura 4.13</b> Estudio de la reversibilidad mediante voltamperometría cíclica a distinto pH 1) pH 2; 2) pH 5; 3) pH 8.....	120
<b>Figura 4.14</b> Estudio de la velocidad de barrido por voltamperometría cíclica.....	123

<b>Figura 4.15</b> Variación de intensidad límite con la concentración de la forma imina del imipenem a pH 2.....	126
<b>Figura 4.16</b> Variación de intensidad límite con la concentración de la forma imina del imipenem.....	126
<b>Figura</b> Variación de la intensidad de pico con la concentración de la forma imina del imipenem.....	131
<b>Figura 4.18</b> Recta de calibrado de la forma imina del imipenem.....	132
<b>Figura 5.1</b> Voltamograma de barrido lineal de cefminox $10^{-7}$ M a pH 6.....	140
<b>Figura 5.2</b> Variación de la intensidad de pico del cefminox con el potencial de acumulación.....	142
<b>Figura 5.3</b> Voltamogramas de cefminox $10^{-6}$ M al variar el tiempo de deposición. (A: 0 s; B: 15 s; C: 30 s; D: 45 s; E: 60 s).....	143
<b>Figura 5.4</b> Influencia del tiempo de deposición sobre la intensidad de pico del cefminox (A: $10^{-9}$ M; B: $10^{-8}$ M; C: $10^{-7}$ M; D: $5 \cdot 10^{-7}$ M; E: $10^{-6}$ M).....	144
<b>Figura 5.5</b> Variación del $\log i_p$ con el $\log V_b$ .....	146
<b>Figura 5.6</b> Variación de $-E_p$ con el $\log V_b$ .....	147
<b>Figura 5.7</b> Variación de la intensidad de pico con la concentración de cefminox.....	148
<b>Figura 5.8</b> Recta de calibrado de cefminox.....	148
<b>Figura 5.9</b> Voltamogramas de cefminox en orina (A: blanco; B: $10^{-8}$ M; C: $10^{-7}$ ; D: $5 \cdot 10^{-7}$ M).....	152
<b>Figura 6.1</b> Voltamograma de barrido lineal de la forma imina del imipenem $10^{-8}$ M a pH 7.....	157
<b>Figura 6.2</b> Voltamogramas de la forma imina del imipenem $10^{-8}$ M al variar el tiempo de deposición (A: 0s; B: 60 s; C: 120 s; D: 180 s; E: 240 s).....	161

<b>Figura 6.3</b> Influencia del tiempo de deposición sobre la intensidad de pico de la forma imina del imipenem (A: $10^{-10}$ M; B: $10^{-9}$ M; C: $6 \cdot 10^{-9}$ M; D: $10^{-8}$ M).....	161
<b>Figura 6.4</b> Variación del $\log i_p$ con el $\log V_b$ .....	163
<b>Figura 6.5</b> Variación de $-E_p$ con el $\log V_b$ .....	165
<b>Figura 6.6</b> Variación de la intensidad de pico con la concentración de Imipenem.....	166
<b>Figura 6.7</b> Recta de calibrado de la forma imina del imipenem.....	166

<b>Tabla 1.1</b> Clasificación de las cefalosporinas.....	14
<b>Tabla 1.2</b> Rango de disminución en pacientes infectados con E.coli.....	25
<b>Tabla 3.1</b> Efecto del pH sobre $E_{1/2}$ e $i_l$ en polarografía tast sobre una disolución de cefminox $10^{-5}$ M.....	65
<b>Tabla 3.2</b> Efecto del pH sobre $E_p$ e $i_p$ en polarografía diferencial de impulso sobre una disolución de cefminox $10^{-5}$ M.....	66
<b>Tabla 3.3</b> Variación de los valores de las intensidades de pico con el tiempo en polarografía diferencial de impulso.....	70
<b>Tabla 3.4</b> Variación de la intensidad y potencial de pico con la variación de la amplitud de impulso aplicado.....	72
<b>Tabla 3.5</b> Variación del logaritmo de la intensidad límite y de pico con la temperatura del cefminox.....	74
<b>Tabla 3.6</b> Coeficientes de temperatura de cefminox en polarografía tast y DPP..	75
<b>Tabla 3.7</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial para el cefminox a pH 4.....	77
<b>Tabla 3.8</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial para el cefminox a pH 6.....	78
<b>Tabla 3.9</b> Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke.....	80
<b>Tabla 3.10</b> Variación de las intensidades de pico con la variación la $V_b$ .....	83
<b>Tabla 3.11</b> Variación de intensidad límite con la concentración de cefminox.....	85
<b>Tabla 3.12</b> Calculo del coeficiente de difusión de cefminox para pH 3.14 y pH 6.....	87
<b>Tabla 3.13</b> Calculo del número de electrones mediante cronoculombimetría a pH 3.14 y pH 6.....	87
<b>Tabla 3.14</b> Reproducibilidad, cálculo de parámetros estadísticos.....	93
<b>Tabla 3.15</b> Influencia de antibióticos sobre la determinación de cefminox.....	95
<b>Tabla 3.16</b> Análisis de muestras de orina dopadas con cefminox mediante DPP.....	97

<b>Tabla 3.17</b> Análisis por DPP de muestras reales de orina tras la administración de 2 g de cefminox.....	98
<b>Tabla 4.1</b> Efecto del pH sobre $E_p$ e $i_p$ en polarografía diferencial de impulso sobre una disolución $10^{-4}$ M de imipenem.....	104
<b>Tabla 4.2</b> Efecto del pH sobre $E_{1/2}$ e $i_l$ en polarografía diferencial de impulso sobre una disolución $10^{-4}$ M de imipenem.....	105
<b>Tabla 4.3</b> Variación de los valores de las intensidades de pico con el tiempo en polarografía diferencial de impulso.....	109
<b>Tabla 4.4</b> Variación de las intensidades y potenciales de pico con la variación de la amplitud de impulso aplicado.....	111
<b>Tabla 4.5</b> Variación del logaritmo de la intensidad límite y de pico de la forma imina del imipenem con la temperatura.....	113
<b>Tabla 4.6</b> Coeficientes de temperatura de imipenem en polarografía tast y DPP.....	114
<b>Tabla 4.7</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial de la forma imina del imipenem a pH 2.....	116
<b>Tabla 4.8</b> Análisis logarítmico de la función intensidad-potencial de la forma imina del imipenem a pH 4.5.....	116
<b>Tabla 4.9</b> Estudio de la reversibilidad. Criterio de Birke.....	119
<b>Tabla 4.10</b> Variación de la intensidad de pico con la variación de la $V_b^{1/2}$ .....	122
<b>Tabla 4.11</b> Variación de la intensidad límite con la concentración de la forma imina del imipenem.....	125
<b>Tabla 4.12</b> Calculo del coeficiente de difusión de la forma imina del imipenem para pH 2 y pH 5.....	127
<b>Tabla 4.13</b> Calculo del número de electrones mediante cronoculombimetría a pH 2 y pH 5.....	128
<b>Tabla 4.14</b> Reproducibilidad. Cálculo de parámetros estadísticos.....	133
<b>Tabla 4.15</b> Análisis de imipenem en preparaciones farmacéuticas.....	136

<b>Tabla 5.1</b> Efecto del pH en la intensidad y potencial de pico mediante voltametría de barrido lineal de cefminox $10^{-6}$ M.....	141
<b>Tabla 5.2</b> Variación de la intensidad de pico con el potencial de acumulación..	142
<b>Tabla 5.3</b> Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación del tiempo de reposo en cefminox $10^{-7}$ M.....	145
<b>Tabla 5.4</b> Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación de la velocidad de barrido en cefminox $10^{-6}$ M.....	146
<b>Tabla 5.5</b> Repetitividad. Cálculo de parámetros estadísticos.....	149
<b>Tabla 5.6</b> Análisis de muestras de orina dopadas con cefminox mediante CAdSV.....	153
<b>Tabla 5.7</b> Análisis por CAdSV de muestras reales de orina tras la administración de 2 g de cefminox.....	154
<b>Tabla 6.1</b> Efecto del pH en la intensidad y potencial de pico mediante voltametría de barrido lineal.....	158
<b>Tabla 6.2</b> Variación de la intensidad de pico con el potencial de acumulación..	159
<b>Tabla 6.3</b> Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación del tiempo de reposo de la forma imina del imipenem $10^{-8}$ M.....	162
<b>Tabla 6.4</b> Valores de intensidad y potencial de pico con respecto a la variación de la velocidad de barrido de la forma imina del imipenem $10^{-8}$ M.....	164
<b>Tabla 6.5</b> Repetitividad. Cálculo de parámetros estadísticos.....	167
<b>Tabla 6.6</b> Análisis de imipenem en preparaciones farmacéuticas.....	170

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Donde el Tribunal de Examen de los cursos de Graduados en el día de la fecha, para el título de Doctorado de D. ABDELILAH HILALI

titulado "Determinaciones voltamperométricas de los antibióticos CEFMINOX E IMIPENEM

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Sevilla, 16 de Diciembre 2003

El Vocal,

El presidente

El Vocal,

El Secretario,

El Vocal,

El Doctorado,

A. Yavalos

WT