

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**Y**

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y**

**TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**



**PROPUESTA DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN ESPECIALIDADES  
FARMACÉUTICAS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

**TESIS DOCTORAL**

**FRANCISCO JOAQUÍN JIMÉNEZ PALACIOS**

**Sevilla 2004**

---

**PROPUESTA DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN ESPECIALIDADES  
FARMACÉUTICAS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

---

**Tesis Doctoral**

**FRANCISCO JOAQUÍN JIMÉNEZ PALACIOS**

**El Director**

**El Director**

**Manuel Callejón Mochón**

Profesor Titular del Departamento de  
Química Analítica de la Universidad de Sevilla

**Joaquín Herrera Carranza**

Profesor Titular del Dpto. Farmacia y  
Tecnología Farmacéutica de la Universidad de  
Sevilla

**El Director**

**Juan Carlos Jiménez Sánchez**

Profesor Titular del Departamento de  
Química Analítica de la Universidad de Sevilla

Memoria presentada para optar al grado  
de Doctor por la Universidad de Sevilla  
por Fco. Joaquín Jiménez Palacios.

**MANUEL CALLEJÓN MOCHÓN Y JUAN CARLOS JIMÉNEZ SÁNCHEZ,**  
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, Y  
**JOAQUÍN HERRERA CARRANZA,** PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO  
DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SEVILLA,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Propuesta de nuevos métodos analíticos para la determinación de cefepima en especialidades farmacéuticas y fluidos biológicos” constituye la Memoria de Investigación que presenta Don **Francisco Joaquín Jiménez Palacios** para aspirar al grado por la Universidad de Sevilla bajo la dirección de los Profesores Titulares Dr. **Manuel Callejón Mochón**, Dr. **Joaquín Herrera Carranza** y Dr. **Juan Carlos Jiménez Sánchez**.

Y para que conste, expedimos y firmamos el presente certificado en Sevilla, a 16 de Febrero de 2004.

Fdo. - Manuel Callejón Mochón

Fdo. - Juan Carlos Jiménez Sánchez

Fdo. - Joaquín Herrera Carranza

**ALFONSO GUIRÁUM PÉREZ**, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la parte experimental del presente trabajo de investigación titulado “Propuesta de nuevos métodos analíticos para la determinación de cefepima en especialidades farmacéuticas y fluidos biológicos” presentado por Don **Francisco Joaquín Jiménez Palacios** para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla bajo la dirección de los Profesores Titulares Dr. **Manuel Callejón Mochón**, Dr. **Joaquín Herrera Carranza** y Dr. **Juan Carlos Jiménez Sánchez**, ha sido realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 16 de Febrero de 2004.

Fdo. - Alfonso Guiráum Pérez

*A Lucía y Marina*

## AGRADECIMIENTOS

A los Profesores Dr. Manuel Callejón Mochón y Dr. Juan Carlos Jiménez Sánchez, sin cuya dirección y dedicación este trabajo no sería una realidad.

Al Profesor Dr. Joaquín Herrera Carranza, que puso su confianza en mí desde un principio para realizar esta ardua labor.

Al Director del Departamento de Química Analítica, Dr. Alfonso Guiráum Pérez, que puso todos los medios a mi disposición para realizar la parte experimental de esta tesis. También expresar mi agradecimiento por su apoyo, a nivel laboral, durante el tiempo que llevo en el Departamento.

A todos los compañeros profesores y doctorandos del Departamento de Química Analítica que, sin querer citar ninguno en especial, han aportado algún granito de arena en la elaboración del presente trabajo. A todos ellos, muchas gracias.

A mis compañeros del P.A.S, Sofía y Gustavo que, cada uno a su forma, me han apoyado en todo momento.

A los integrantes del grupo de investigación del Servicio de Unidad de Cuidados Críticos y del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, por su disposición y colaboración en la obtención de muestras reales.

A mis padres Joaquín y Concepción, que gracias a sus esfuerzos durante muchos años de su vida, han logrado que haya llegado a este punto. También una mención especial a mis hermanos Inmaculada, Margarita y José Daniel. Os estaré eternamente agradecido.

A mi esposa Nieves, que desde que la conocí me ha apoyado incondicionalmente con su esfuerzo para que, entre otras cosas, me pueda dedicar plenamente a la elaboración de esta tesis doctoral.

*«Y le arrojó Yavé del jardín del Edén a  
labrar la tierra de que había sido tomado. »*

*Y nació el dolor.  
Y Él, en su infinita bondad,  
le dio al hombre inteligencia para vencer al dolor.*

*(Génesis 3-23)*

---

**INDICE**





1.2.6.- Reacciones adversas.	42
1.2.7.- Indicaciones.	44
1.2.8.- Utilidad de cefepima en el tratamiento de infecciones en la unidad de cuidados intensivo (UCI).	46
1.2.8.1.- Características de las infecciones en la UCI.	47
1.2.8.2.- Indicaciones de la cefepima en las infecciones graves en UCI.	51
1.2.9.- Ficha técnica de cefepima.	54
1.3.- Métodos instrumentales aplicados en el análisis de las cefalosporinas.	57
1.3.1.- Espectrofotometría ultravioleta-visible.	58
1.3.2.- Métodos polarográficos.	60
1.3.3.- Voltamperometría de redisolución adsorbtiva.	64
1.3.4.- Cromatografía líquida de alta eficacia.	66
1.3.5.- Antecedentes bibliográficos sobre métodos de determinación de cefepima.	70

## **CAPÍTULO 2**

---

### **INSTRUMENTACIÓN. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.**

#### **MÉTODOS MATEMÁTICOS.**

2.1 - Instrumentación.	79
2.2 - Reactivos y disoluciones.	80
2.3 - Tratamiento de los resultados analíticos.	81
2.3.1 - Calibración.	81
2.3.2.- Validación de un método analítico.	84
2.3.3.- Evaluación de la veracidad.	87

### **CAPÍTULO 3**

#### **ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO Y DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS**

3.1.- Estudios previos.	95
3.2.- Influencia del pH.	97
3.3.- Influencia de la amplitud de impulso aplicado.	99
3.4.- Influencia de la velocidad de barrido.	101
3.5.- Influencia de la temperatura.	102
3.6.- Estudios de la naturaleza del proceso electroquímico.	105
3.6.1.- Estudios de la reversibilidad.	105
3.6.2.- Estudios de caracterización del proceso electroquímico.	111
3.7.- Determinación del coeficiente de difusión y del número de electrones.	115
3.8.- Mecanismo de reducción de la cefepima.	117
3.9.- Recta de calibrado.	118
3.10.- Repetitividad.	120
3.11.- Límites de detección y cuantificación.	120
3.12.- Procedimiento recomendado para la determinación de la cefepima.	121
3.13.- Interferencias.	121
3.14.- Determinación de la cefepima en especialidades farmacéuticas.	122
3.15.- Determinación de la cefepima en fluidos biológicos.	123
3.15.1.- Determinación de la cefepima en orina.	123
3.15.2.- Determinación de la cefepima en suero humano.	126
3.16.- Estabilidad.	129

### **CAPÍTULO 4**

#### **DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA POR VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ADSORTIVA CATÓDICA**

4.1.- Estudios previos.	135
4.2.- Influencia del pH.	137
4.3.- Influencia de la temperatura.	137

4.4.- Influencia del potencial de acumulación.	138
4.5.- Influencia del tiempo de deposición.	140
4.6.- Influencia del tiempo de reposo y la velocidad de agitación.	141
4.7.- Influencia de la velocidad de barrido.	143
4.8.- Recta de calibrado.	145
4.9.- Repetitividad.	146
4.10.- Límites de detección y cuantificación.	146
4.11.- Procedimiento recomendado para la determinación de la cefepima.	147
4.12.- Determinación de cefepima en fluidos biológicos.	147
4.12.1.- Determinación de cefepima en orina.	147
4.12.2.- Determinación de cefepima en líquido cefalorraquídeo.	152

## **CAPÍTULO 5**

### **ESTUDIOS Y APLICACIONES DE LAS PROPIEDADES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE CEFEPIMA**

5.1.- Espectros de absorción en disolventes orgánicos.	157
5.2.- Comportamiento frente agentes rédox e iones inorgánicos.	160
5.3.- Influencia del pH sobre los espectros de absorción en disolución acuosa.	161
5.4.- Determinación de las constantes de disociación.	163
5.4.1.- Determinación espectrofotométrica.	163
5.4.2.- Determinación potenciométrica.	167
5.5.- Recta de calibrado.	169
5.6.- Repetitividad.	170
5.7.- Límites de detección y cuantificación.	171
5.8.- Procedimiento propuesto para la determinación de cefepima.	171
5.9.- Determinación del contenido de cefepima en especialidades farmacéuticas.	172

## **CAPÍTULO 6**

---

### **DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

6.1.- Optimización de las condiciones cromatográficas.	175
6.1.1.- Optimización del pH en la fase móvil.	175
6.1.2.- Selección de la longitud de onda.	176
6.1.3.- Optimización de la proporción entre fase orgánica y fase acuosa en la fase móvil.	176
6.1.4.- Influencia de la concentración del tampón.	177
6.1.5.- Estudio del flujo de la fase móvil.	178
6.2.- Procedimiento de validación del método cromatográfico.	179
6.2.1.- Prevalidación.	183
6.2.1.1.- Cualificación del equipamiento analítico.	183
6.2.1.2.- Estabilidad de las soluciones.	184
6.2.1.3.- Test de aptitud del sistema.	184
6.2.2.- Validación.	185
6.2.2.1.- Exactitud.	186
6.2.2.2.- Precisión.	188
6.2.2.3.- Linealidad.	188
6.2.2.4.- Límites de detección y de cuantificación.	190
6.2.2.5.- Especificidad.	190
6.2.2.6.- Robustez.	191
6.3.- Procedimiento propuesto para la determinación de cefepima.	192
6.4.- Determinación de cefepima en fluidos biológicos.	193
6.4.1.- Determinación de cefepima en suero.	193
6.4.2.- Determinación de cefepima en líquido cefalorraquídeo.	197
6.4.3.- Determinación de cefepima en orina.	199
6.5.- Comparación del método propuesto con otros existentes.	200

## **ANEXO**

---

### **ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO DE CEFEPIMA**

A.1.- Introducción.	205
A.2.- Diseño del estudio de cefepima en pacientes hospitalizados.	206
A.2.1.- Población.	206
A.2.2.- Tratamiento	207
A.2.3.- Criterios de interrupción	207
A.2.4.- Metodología.	207
A.3.- Análisis farmacocinético y farmacodinámico.	208
A.4.- Conclusiones.	239
<b>CONCLUSIONES</b>	247
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	253
<b>INDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS</b>	271

---

**OBJETO DE LA TESIS**

El objeto de esta Tesis es el estudio electroquímico, espectrofotométrico y cromatográfico de la cefepima, una cefalosporina de cuarta generación de importante actividad antibacteriana, con el fin de establecer procedimientos analíticos para su determinación en plasma, líquido cefalorraquídeo y orina. Este estudio tiene gran interés dado que este fármaco ha sido desarrollado en los últimos años y es de gran uso en pacientes con neumonía nosocomial.

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

- ✓ Recopilación y análisis de los antecedentes bibliográficos sobre los métodos analíticos en la determinación de este compuesto, sobre las propiedades físico-químicas y propiedades generales, que sirvan de base a la planificación de las etapas posteriores.
- ✓ Estudio del comportamiento electroquímico de la cefepima, empleando diferentes técnicas voltamperométricas, estableciendo la influencia de las variables que intervienen, con el objeto de desarrollar métodos electroquímicos para la determinación de este compuesto en fluidos biológicos.
- ✓ Estudio de las posibilidades espectrofotométricas de la cefepima realizando la determinación de sus constante de disociación.
- ✓ Desarrollo de un método de análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de la cefepima y su aplicación a muestras de fluidos biológicos.



## **CAPÍTULO 1**

---

### **INTRODUCCIÓN**

En este capítulo se va a recoger, de forma generalizada, las características más importantes de las cefalosporinas, incluyendo desde aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos hasta antecedentes bibliográficos sobre los métodos instrumentales empleados en la determinación de estos fármacos. Esta metodología se aplicará al estudio monográfico del fármaco objeto de esta memoria como es la cefepima.

### 1.1.- CEFALOSPORINAS

Las cefalosporinas son uno de los grupos de antibióticos más utilizados en medicina; pertenecen, como las penicilinas, los monobactanes y los carbapenemes, al grupo de los betalactámicos y generan un importante gasto dentro de la salud pública.

En 1945 Giuseppe Brotzu mantenía la hipótesis de que la antibiosis podía ser la causa de la destrucción de los bacilos tifoideos de las aguas residuales. Tomó una muestra de agua de mar, próxima al desagüe del alcantarillado de Calgary en Italia, y aisló el hongo *Cephalosporium acremonium*, que demostró poseer un amplio espectro bactericida. En 1948 publicó estos resultados [1] y envió una copia de este trabajo y un cultivo del hongo a la Escuela de Patología William en Oxford, donde conjuntamente con Edward P. Abraham y su equipo, encontraron que este hongo inhibía el crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, y que producía como mínimo dos antibióticos. El primero fue denominado cefalosporina P (con actividad sobre Gram positivos), era de naturaleza esteroidea y con poca actividad antimicrobiana, semejante al ácido fusídico encontrado una década más tarde. En 1949, descubrieron un segundo antibiótico más interesante, con un intervalo más amplio de actividad, incluidos Gram negativos, la cefalosporina N [2]. Se comprobó que estaba formado por un péptido inestable de estructura similar a la penicilina, por lo que pasó a denominarse penicilina N. Un tercer antibiótico producido por el hongo, la cefalosporina C, se descubrió como consecuencia de estudios químicos con la penicilina N, encontrándose por cromatografía una nueva sustancia con diferente absorción ultravioleta, y de su estructura química derivaron las primeras cefalosporinas de uso clínico [3-5]. En la Figura 1.1 se representa la estructura química de la cefalosporina C.

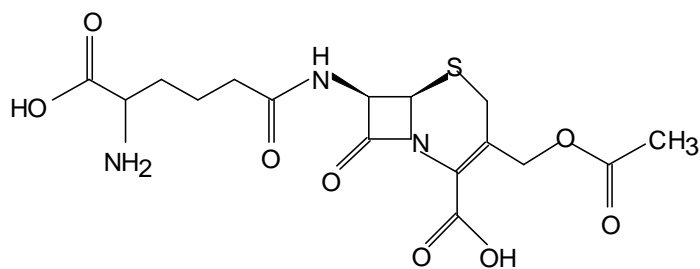


Figura 1.1. Estructura de la cefalosporina C.

Desde la comercialización de la cefalotina en el año 1962, las cefalosporinas han ascendido a una posición de distinción en el mundo de los antibióticos, y han llegado a adquirir gran importancia en el tratamiento de las infecciones bacterianas por su relativa baja toxicidad, amplio espectro antibacteriano, actividad bactericida y actividad frente a betalactamasas.

### 1.1.1.- CLASIFICACIÓN

En la década de los setenta, cuando el número de cefalosporinas disponibles era aún relativamente pequeño y tenían además la particularidad de presentar una actividad antibacteriana similar, era fácil distribuir las en tres grupos, atendiendo a la vía de administración más frecuentemente empleada: oral, intramuscular e intravenosa. Dentro de cada grupo, los compuestos eran más o menos idénticos en cuanto a su eficacia clínica [6]. No obstante, se pudo comprobar que cada nueva cefalosporina que iba apareciendo poseía un intervalo de actividad distinto, un perfil de resistencias a las betalactamasas característico y diferente, así como distintas propiedades farmacocinéticas. Por tanto, fue necesario ordenar el amplio número de cefalosporinas, a fin de facilitar la comunicación cuando se hace referencia a este grupo de agentes antimicrobianos.

A las cefalosporinas se las puede clasificar por su estructura química, su farmacocinética, su resistencia a las betalactamasas, por otras propiedades e incluso combinando dos o más criterios, pero a efectos prácticos la que más éxito ha tenido es la clasificación arbitraria por generaciones, que está basada en su actividad antimicrobiana. En la Tabla 1.1 se recoge la clasificación de las cefalosporinas.

Tabla 1.1. Clasificación de las principales cefalosporinas por generaciones.

Primera	Segunda	Tercera	Cuarta
Cefalotina	Cefoxitina	Cefotaxima	Cefpiroma
Cefalexina	Cefamandol	Cefsulodina	Cefepima
Cefaloridina	Cefuroxima	Cefoperazona	
Cefazolina	Cefaclor	Latamoxef	
Cefapirina	Cefmetazol	Ceftriaxona	
Cefradina	Cefotian	Ceftizoxima	
Cefaloglicina	Cefonicid	Ceftazidima	
Cefazedona	Cefotetan	Cefmeroxima	
Cefacetrilo	Cefprozilo	Cefpiramida	
Cefadroxilo	Loracarbef	Cefixima	
		Cefterama	
		Cefminox	
		Cefpodoxima	
		Cefnidir	
		Cefetamet	
		Ceftibuteno	
		Cefozopram	

Las cefalosporinas de primera generación son activas frente a bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas; las de segunda generación aumentan su actividad frente a bacterias Gram negativas, aunque la disminuyen ligeramente frente a Gram positivas; las de tercera y cuarta generación son muy activas en bacterias Gram negativas, pero menos frente a Gram positivas, salvo excepciones. Las de cuarta generación, además de tener actividad frente a cocos Gram positivos y Gram negativos, incluye en su espectro a *Pseudomonas aeruginosa* y muchas enterobacterias productoras de betalactamasas cromosómicas inducibles.

### 1.1.2.- ESTRUCTURA QUÍMICA

La molécula de la cefalosporina C es semejante a la de la penicilina, ya que posee un anillo betalactámico, en este caso unido a un anillo dihidrotiazínico y un residuo aminodipídico. Por hidrólisis ácida de la cefalosporina C se consigue el ácido 7-amino cefalosporínico, representada en la Figura 1.2, formado también por la unión de los dos anillos, betalactámico y dihidrotiazínico, el cual representa la estructura básica para el desarrollo de las futuras cefalosporinas. Esta molécula tiene varios sitios de potencial manipulación química, como se muestra en la Figura 1.3; las modificaciones con significación terapéutica importante se han realizado en el átomo de azufre y en las posiciones 7 ( $R_1$ ) y 3 ( $R_2$ ), dando lugar a las diferentes cefalosporinas que hoy conocemos [7,8].

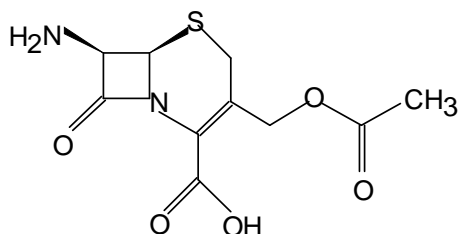


Figura 1.2. Ácido 7-amino cefalosporínico.

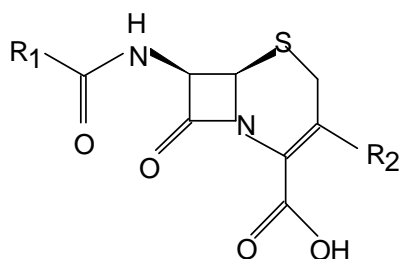


Figura 1.3. Puntos de modificación del ácido 7-amino cefalosporínico.

Por lo general, las distintas sustituciones en posición 3 del anillo dihidrotiazínico se asocian con modificaciones en la farmacocinética del producto; las sustituciones en la posición 7 del ácido 7-amino cefalosporínico determinan diferente actividad antimicrobiana.

Como ejemplo de lo anteriormente descrito, tenemos que la presencia de un grupo metoxiimino en la posición 7, como se encuentra en la cefuroxima, cefotaxima, ceftizocima, ceftriazona y cefepima, confiere mayor estabilidad betalactámica [9]; la ceftazidima tiene un grupo propilcarboxil en este sitio que produce una mayor actividad contra Gram positivos [10].

La cefoxitina y el cefotetan se distinguen por la presencia de un grupo metoxi en la posición 7 que le confiere resistencia a las betalactamasas de los gérmenes Gram negativos, aunque reduce la afinidad por las proteínas fijadoras de penicilinas [11].

La ceftriaxona posee una semidesintegración poco común relacionada con la presencia de una triacina en la posición 3 [12]. La cefalotina, cefapirina y cefotaxima se convierten en derivados desacetilados debido a que comparten un grupo acetoxi en dicha localización [8].

La hipoprotobinemia y las reacciones similares a disulfirán se deben a la presencia de un grupo metiltiotetrazol en la posición 3 de cefamandol, cefotetan y cefoperazona [13].

Se puede resumir que las modificaciones bioquímicas para mejorar el espectro y la actividad se dirigen a aumentar la penetración a través de la pared celular de la bacteria, disminuir la sensibilidad a las betalactamasas y conseguir más afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina [14-17]. Cualquier cefalosporina requiere, para ser eficaz, la estructura tridimensional y sustituciones adecuadas en los distintos radicales mencionados.

### 1.1.3.- MECANISMO DE ACCIÓN

Las cefalosporinas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. En las bacterias Gram negativas, la pared celular está formada por polímeros de fosfolípidos con proteínas, por medio de las cuales forman poros de comunicación con el exterior. Debajo de esta cubierta externa está situada la capa de peptidoglicano, que es un mucopéptido (mureína) constituido por cadenas lineales de polisacáridos, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas entre sí por cadenas cortas de péptidos. Las bacterias Gram positivas tienen una pared mucho más sencilla, formada fundamentalmente por mureína. La estructura rígida de la pared celular bacteriana se debe al peptidoglicano, por lo que una interferencia en su biosíntesis puede dar lugar a una pérdida de la forma de la célula y del contenido interno de la misma, produciéndose la lisis y muerte de la bacteria.

La biosíntesis de la pared bacteriana es un proceso complicado en el que intervienen gran número de enzimas y que puede dividirse en tres etapas distintas. En la primera etapa un precursor de la pared celular, el uridin difosfato (UDP)-acetil muramil pentapéptido, se une en primer lugar al fosfolípido y posteriormente a la UDP-N-acetilglucosamina de la membrana celular. Este pentapéptido disacárido se enlaza con subunidades preexistentes en la pared celular para producir un polímero lineal, el peptidoglicano. La etapa final del desarrollo de la pared, se realiza fuera de la membrana celular y consiste en la unión de las cadenas de los polímeros de peptidoglicano mediante puentes peptídicos [16]. En esta etapa es en la que actúan las cefalosporinas, impidiendo la transpeptidación, por inhibición competitiva, ya que el núcleo betalactámico es un análogo estructural de la D-alanil-D-alanina, componente del pentapéptido del ácido murámico. Las enzimas de membrana a las que se unen estos antibióticos, se denominan proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y están implicadas en distintas fases de la división celular. Las distintas cefalosporinas presentan diferente afinidad por las PBP; el efecto antibacteriano dependerá de los PBP inactivados y, así, si se fijan a las PBP 1a, 1b, 2 ó 3 se producirá la muerte de la bacteria, pero si se fijan a las PBP 4, 5 ó 6 no habrá muerte celular ya que éstas no son necesarias para la supervivencia. Morfológicamente, las bacterias bacilares, bajo la acción de determinadas cefalosporinas, como son la cefalexina, cefradina y cefuroxima a bajas concentraciones, tienden a producir filamentos, mientras que cuando se las somete a la

acción de la cefaloridina o cefazolina adquieren forma de esteroplastos. Esto se debe a la distinta afinidad por las PBP, sobre todo a la 3, de cada uno de los antibióticos. Tal manera de actuar condiciona que la acción sea bactericida [18].

#### **1.1.4.- RESISTENCIA BACTERIANA**

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos constituye una seria amenaza para el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas. El aumento de bacterias resistentes es la consecuencia directa del uso incorrecto y del abuso de los antibióticos, debiéndose tener en cuenta que los efectos que se derivan de una inadecuada utilización de estos agentes terapéuticos influyen no sólo en la capacidad para tratar una infección sino también en el coste y duración de los tratamientos [19].

La resistencia a las cefalosporinas puede ocurrir en cualquier paso involucrado en la actividad del agente antimicrobiano: disminución de la permeabilidad, inactivación por betalactamasas, modificación de las PBP diana y por la llamada tolerancia al antibiótico.

##### **1.1.4.1.- Disminución de la permeabilidad**

Las moléculas betalactámicas deben ser capaces, en primer lugar, de atravesar la pared celular bacteriana. Aunque los componentes del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram positivas pueden ser atravesados con facilidad, la pared de las bacterias Gram negativas (compuestas de lípidos, proteínas y polisacáridos) pueden impedir a los antibióticos betalactámicos que alcancen sus dianas PBP. No obstante, la pared celular de las bacterias Gram negativas tiene unos canales, formados por proteínas llamadas porinas, por los que se produce la difusión de materiales al interior de la bacteria. Estas porinas pueden bloquear el paso de los componentes betalactámicos dependiendo de su tamaño, carga y propiedades hidrófilas [20].

Las propiedades de la pared celular pueden ser inherentes a una bacteria dada o ser el resultado de cambios en la estructura de la pared celular por la exposición a los antibióticos [21].



#### **1.1.4.2.- Modificación de las PBP diana**

Las alteraciones en las características de unión de las PBP con los betalactámicos constituyen un mecanismo de resistencia importante, como se ha demostrado en diversas bacterias: *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* produce las PBP 2a, que tienen una afinidad marcadamente reducida a la unión de las cefalosporinas [22,23]. Para producir una cepa de *Escherichia coli* resistente a cefalexina, cefadroxilo, cefradina, cefalotina, cefuroxima, cefamandol, cefotaxima, ceftazidima y cefoperazona, solamente es necesario sustituir cuatro aminoácidos de las PBP 3 [24]. Pero existe además otro mecanismo de resistencia que consiste en la formación de PBP no esenciales de bajo peso molecular, pero con gran afinidad a los betalactámicos, con lo que se produce una inmovilización del antibiótico por estas proteínas, impidiendo su unión con las PBP esenciales.

#### **1.1.4.3.- Tolerancia al antibiótico**

La tolerancia al antibiótico es otro mecanismo de resistencia. Las bacterias poseen enzimas autolíticas que se activan por los betalactámicos dando lugar a la lisis de la célula. No obstante, en algunas especies bacterianas como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, no se produce la lisis celular debido a un mecanismo de resistencia, mediante el cual las bacterias pierden estas enzimas autolíticas. Las cepas mutantes mantienen las concentraciones mínimas inhibitorias características de la especie bacteriana, pero mueren muy lentamente, por lo que la acción del antibiótico en estos casos se puede considerar bacteriostática más que bactericida.

#### **1.1.4.4.- Inactivación por betalactamasas**

El más importante mecanismo de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos es la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan la unión cíclico-amida del anillo betalactámico y lo inactivan [25].

De entre las diferentes clasificaciones propuestas para estas enzimas, la más aceptada en la actualidad es la de Bush-Jacoby-Medeiros de 1995 [26], en la que se

distinguen 4 grupos (de los que, a su vez, el grupo 2 incluye 8 subgrupos) en función del perfil de sustrato, el perfil de inhibición, el punto isoeléctrico y la secuencia del gen correspondiente. Con anterioridad Richmond y Sykes [27] habían propuesto otra clasificación de las betalactamasas de las bacterias Gram negativas basada en el perfil de sustrato, y Ambler [28], igualmente, propuso otra clasificación según la estructura molecular de la enzima.

Las enzimas de mayor interés en enterobacterias se incluyen en los grupos 1 (cefalosporinasas pobremente inhibidas por ácido clavulánico, clase I de Richmond y Sykes y clase molecular C de Ambler) y en muchos de los subgrupos del grupo 2. En la Tabla 1.2 se recoge estos dos grupos de betalactamasas en enterobacterias.

Tabla 1.2. Principales grupos de betalactamasas en enterobacterias.

Grupo (Bush y cols.)	Clase (Richmond- Sykes)	Clase molecular	Sustrato preferido	Enzimas
1	I	C	Cefalosporinas	Cromosómicas de clase C Cefamicinasas plasmídicas
2b	III	A	Penicilinas Cefalosporinas	Betalactamasas de espectro ampliado
2bc	-	A	Penicilinas Cefalosporinas Monobactames	Betalactamasas plasmídicas de espectro extendido
2br	-	A	Penicilinas	Betalactamasas resistentes a inhibidores
2c	II, IV	A	Penicilinas	Carbencilinas inhibidas por ácido clavulánico
2d	V	D	Penicilinas Cloxacilina	Cloxacilinasas
2e	Ic	A	Cefalosporinas	Cefalosporinasas inducibles de clase A
2f	-	A	Cefalosporinas Penicilinas Carbapenemes	Carbapenemasas

El nivel de resistencia antibiótica en una población bacteriana, debido a una betalactamasa, está determinado por distintas variables: concentración del antibiótico, concentración de la enzima, afinidad del antibiótico por las betalactamasas y de su estabilidad a las enzimas.

Las bacterias Gram positivas liberan las betalactamasas directamente a su entorno. Muchas cefalosporinas, excepto cefaloridina, son pobremente hidrolizadas por las betalactamasas estafilocócicas. Las bacterias Gram negativas liberan las betalactamasas en su espacio periplásmico, lo que las hace más eficaces para destruir a las cefalosporinas conforme llegan a través de las porinas. El aumento en la producción de betalactamasas puede dar como resultado la resistencia de la bacteria a las cefalosporinas. La hiperproducción de betalactamasas de espectro ampliado, produce resistencia a las cefalosporinas de primera y segunda generación. Las betalactamasas cromosómicas inducibles presentes en muchas enterobacterias, como *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *M. morganii*, *Serratia sp.* y *Providencia sp.* y en *P. aeruginosa* tienen suficiente afinidad por los betalactámicos, como para inactivar a las cefalosporinas más desarrolladas. La inducción se produce generalmente por exposición de la bacteria a cefoxitina y cefalosporinas de tercera generación.

La existencia de genes de betalactamasas en plásmidos y trasposones asegura que una enzima originalmente producida por un único grupo de bacterias, más pronto o más tarde, puede aparecer en otros grupos. La amplia difusión del uso de antibióticos favorece el aumento de resistencias a los antibióticos. De ahí que sea necesario realizar lo que ha venido a llamarse, un uso racional del medicamento.

### **1.1.5.- FARMACOCINÉTICA**

Varios de estos antimicrobianos pueden ser absorbidos por vía oral: entre las cefalosporinas de primera generación cefradina, cefalexina y cefadroxilo; entre las de segunda generación cefaclor, cefuroxima axetil y cefprozilo; y entre las de tercera generación cefixima, cefpodoxima proxetilo y ceftibuteno. Destacar el aumento de la biodisponibilidad oral de las cefalosporinas esterificadas (cefuroxima y cefpodoxima proxetilo) con los alimentos. El efecto se debe a que los alimentos inhiben la esterasas intraluminales, lo que reduce la tasa de hidrólisis en el estómago. Los demás agentes deben ser administrados por vía parenteral. En las Tablas 1.3 y 1.4 se presentan algunos datos significativos de la farmacocinética de estos antibióticos.





La insuficiencia renal prolonga la semivida de todos los preparados, por lo que es necesario ajustar la dosis en función del aclaramiento de creatinina [29, 30], a excepción de la ceftriazona por su doble eliminación biliar y renal.

Las concentraciones séricas de las cefalosporinas son similares para una dosis y vía de administración dadas. Entre las cefalosporinas de primera y segunda generación solo la cefuroxima es capaz de alcanzar en el líquido cefalorraquídeo una concentración suficiente para el tratamiento de la meningitis, al igual que las cefalosporinas parenterales de tercera generación, sobre todo cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidina. Las cefalosporinas atraviesan la placenta y alcanzan concentraciones elevadas en líquido sinovial, pericárdico, peritoneal y pleural. Las cefalosporinas de primera y segunda generación no penetran en el humor acuoso ni en el vítreo. Las concentraciones de la 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 ó 12 horas. Cefonicid, cefixima y ceftriazona 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.

#### **1.1.6.- REACCIONES ADVERSAS**

Las cefalosporinas son consideradas entre los agentes antimicrobianos más inocuos [1]. Las reacciones de hipersensibilidad es uno de los efectos secundarios que pueden presentarse durante el tratamiento, pero su frecuencia es muy baja y las reacciones graves o fatales son raras. Estas reacciones pueden ser originadas por los antígenos que reaccionan de forma cruzada con los de la penicilina. Esto puede ser debido a la similitud estructural de estos grupos de antibióticos, que poseen un anillo betalactámico común [31].

Las cefalosporinas se consideran como agentes nefrotóxicos potenciales, pero solamente se ha descrito necrosis tubular renal con cefaloridina en dosis superiores a 4 g al día. El resto de cefalosporinas, administradas a las dosis recomendadas, raramente producen una toxicidad renal significativa.

Otros efectos secundarios poco frecuentes incluyen diarreas, producidas principalmente por cefoperazona debido a su eliminación biliar, tromboflebitis, con la administración intravenosa debido al carácter ácido de estos antibióticos, neutropenia y trombocitosis, colitis pseudomembranosa y la elevación de transaminasas [32].

Las cefalosporinas que tienen radical metiltiotetrazol en la posición 3 (cefamandol, cefoperazona y cefotetán) pueden originar reacción tipo disulfirán si el paciente ingiere alcohol; también bloquean la síntesis de protombina y otros factores dependientes de la vitamina K, con el consiguiente riesgo de hemorragia. Durante la administración de estas cefalosporinas a dosis altas o por tiempo prolongado a pacientes ancianos debilitados, es necesario determinar periódicamente el tiempo de protombina y administrar vitamina K.

#### **1.1.7.- ESTABILIDAD**

El estudio de estabilidad de las cefalosporinas es de gran interés por la repercusión sanitaria que tiene, ya que existe una correlación entre la inestabilidad de la molécula y la pérdida de actividad antibacteriana y además, algunos productos de degradación están implicados en las reacciones alérgicas que se presentan durante la utilización de estos antibióticos [33]. Por consiguiente, es necesario conocer los factores críticos que afectan a la estabilidad de estos compuestos, tanto en estado sólido como en las soluciones extemporáneas, las posibles rutas de degradación y la estructura de los productos de degradación que pueden originarse.

En estado sólido, los factores que inciden sobre la inestabilidad de estos compuestos son la humedad, la temperatura, el oxígeno del aire y las características de la estructura del polvo. Se ha demostrado que la cefoxitina sódica es considerablemente más estable en forma cristalina que en la correspondiente forma amorfa [34].



Por otra parte, la cefradina en presencia de agua y oxígeno se oxida a cefalina, donde el hierro tiene un efecto catalizador en el proceso.

Las cefalosporinas en solución, pueden seguir distintas rutas de degradación que son dependientes de la temperatura, pH, concentración y naturaleza del solvente utilizado. En solución acuosa se produce con facilidad la ruptura del enlace  $\beta$ -lactámico, obteniéndose además un considerable número de productos secundarios de degradación, tipo piperacina [35] o lactona correspondiente [36]. Por otra parte, se ha demostrado que la temperatura cataliza el proceso hidrolítico, por lo que las soluciones mantenidas bajo refrigeración presentan una vida mas larga. Si se mantiene constante la temperatura, la estabilidad de un mismo solvente va a depender de la concentración del antibiótico, siendo más inestables las soluciones de mayor concentración.

#### **1.1.8.- APLICACIÓN CLÍNICA**

Las cefalosporinas son antibióticos de amplia utilización en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Los ensayos clínicos han demostrado que son agentes efectivos tanto en la terapia como en el tratamiento profiláctico de las infecciones. En el pasado, no se habían establecido como antibióticos de primera elección para ninguna indicación clínica, pero el desarrollo de las moléculas de tercera y cuarta generación que presentan una ampliación del espectro hacia bacterias Gram negativas, ha modificado las pautas de prescripción y muchas de estas cefalosporinas se consideran actualmente como terapia estándar para el tratamiento de determinados procesos infecciosos.

En la Tabla 1.5 se recoge los espectros antibacterianos que presentan algunas de las cefalosporinas [37].



Las cefalosporinas de primera generación continúan siendo el antimicrobiano de elección para la terapéutica empírica como un solo fármaco en muchas enfermedades infecciosas adquiridas en nuestro medio. Por su actividad predominante frente a cocos Gram positivos constituyen los antimicrobianos de primera línea en la mayor parte de las infecciones cutáneas y de los tejidos blandos, excepto en las infecciones por úlcera de decúbito y en las de miembros inferiores de pacientes diabéticos en los cuales debemos usar antimicrobianos como una cobertura anaeróbica. Son sumamente eficaces en el tratamiento de la sepsis urinaria y colecistitis no complicada al inhibir a la *E. coli*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae* [38-40].

Son útiles también las cefalosporinas de primera generación en el tratamiento de neumonías, excepto en infecciones severas por *H. influenzae* y *K. pneumoniae*; aunque esta última es sensible *in vitro* es preferible usar cefalosporinas de generaciones más recientes, debido a que tienen una actividad superior frente a ellas. Son preferidas en la profilaxis quirúrgica de la cirugía torácica, ortopédica y abdominal, y constituye la única excepción la cirugía colorrectal que requiere un antimicrobiano con actividad anaeróbica superior [41, 42].

Nunca deben usarse cefalosporinas de primera generación en el caso de infecciones que afecten el sistema nervioso central, pues no alcanzan concentraciones terapéuticas en líquido cefalorraquídeo aún cuando las meninges estén inflamadas [43].

Las cefalosporinas de segunda generación son activas contra los gérmenes que cubren la primera generación de cefalosporinas, pero además, amplían su espectro contra gérmenes Gram negativos y algunos anaerobios.

*Proteus indol* positivo, *Klebsiella* y *Enterobacter sp*, son sensibles a los compuestos de esta generación. El cefamandol, cefuroxima, cefomicid y el cefaclor son eficaces contra *M. Catarrhalis* y *H. Influenzae*, incluyendo las cepas de este último productoras de betalactamasas [44-46]. La cefoxitina y cefotetán tienen muy buena actividad antianaerobia, incluyendo a *B. fragilis* (80-90% de las cepas son sensibles). No ocurre así frente a *Enterobacter* y *H. influenzae*. De forma general las cefalosporinas de segunda generación son poco activas frente a *Serratia*, *Pseudomona* y *Enterococos*.

La cefuroxima constituye el único de estos medicamentos que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica en cantidades suficientes para ser útil.

Las cefalosporinas de tercera generación poseen ventajas sobre las anteriormente señaladas, aunque en su estructura bioquímica se diferencian poco pues poseen el mismo núcleo cefalosporánico que las de primera y segunda generación.

Estas cefalosporinas constituyen una verdadera revolución dentro del arsenal terapéutico de estos últimos años, sus propiedades farmacocinéticas y su espectro antimicrobiano así lo confirman, su vida media prolongada con concentraciones óptimas en sangre, la posibilidad de administración por vía parenteral (IV o IM), así como su amplio poder bactericida (más activo frente a cocos Gram positivos, mayor acción frente a bacterias Gram negativas y acción contra gérmenes anaerobios) son características que ofrecen una nueva alternativa terapéutica.

Es importante destacar la capacidad de difusión de estos fármacos, tanto en tejidos blandos como óseos, interactuando además, a nivel de la barrera hematoencefálica en casos de sepsis de sistema nervioso central [47-52].

En los últimos años ha surgido una cuarta generación de cefalosporinas que aportan las siguientes ventajas terapéuticas:

- ✓ Grupo betalactámico mucho más estable.
- ✓ Mayor resistencia a las betalactamasas.
- ✓ Mayor penetración celular.
- ✓ Más activa frente a gérmenes anaerobios.
- ✓ Mayor acción antipseudomona.
- ✓ Mayor penetración en tejidos.

Cefepima es la cefalosporina de este grupo que ha gozado de mayor aceptación y utilidad en el tratamiento de sepsis polimicrobianas, donde se incluyen naturalmente gérmenes anaeróbicos [53].

## 1.2.- CEFEPIMA

Las infecciones bacterianas siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, a pesar de la introducción continua de nuevos antimicrobianos en la práctica clínica, y contribuyen de modo significativo al aumento del coste de los cuidados de salud. En España, la prevalencia media de infección hospitalaria en la década de los 90 fue de un 24.2 %, siendo el área de atención intensiva donde se encuentran las mayores prevalencias de todo el hospital, como es de esperar, debido al impacto de los factores de riesgo intrínsecos y a la gravedad de los enfermos ingresados en estas unidades. Cabe destacar el gran uso de las cefalosporinas, que junto con las quinolonas y los aminoglucósidos, son los grupos de antimicrobianos más usados en las infecciones nosocomiales [54].

La cefepima es una cefalosporina de cuarta generación de uso parenteral perteneciente a la familia de los antibióticos betalactámicos, cuyo amplio espectro antimicrobiano frente a microorganismos gram-positivos y gram-negativos le confiere una elevada utilidad potencial para el tratamiento de muchas de las infecciones hospitalarias. La cefepima posee un espectro de actividad *in vitro* equiparable al de las cefalosporinas de tercera generación, aunque es más activa frente a cepas multirresistentes de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Serratia*. Además, tiene una actividad similar a la de la ceftazidima frente a *P. aeruginosa* y superior frente a especies de *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

Lo anteriormente expuesto, junto al hecho de que cefepima posee buenos resultados *in vitro* e *in vivo* y debido a su baja incidencia de efectos secundarios, hacen que este fármaco sea un agente antimicrobiano de gran relevancia en el tratamiento de las infecciones hospitalarias.

### 1.2.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES QUÍMICAS

La versatilidad química del núcleo cefalosporínico ha permitido múltiples modificaciones por sustitución de los grupos químicos en las posiciones 1, 3 y 7, dando lugar a nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas y farmacocinéticas diferentes y cada vez más favorables para el tratamiento de la infección bacteriana.

Estructuralmente, la cefepima es semejante a las aminotiazolil cefalosporinas de tercera generación por poseer un grupo aminotiazol-metoxiimino en la posición 7 del núcleo cefalosporínico. Este grupo confiere a la cefepima una gran estabilidad frente a las betalactamasas y aumenta su actividad intrínseca frente a los gram-negativos. Las modificaciones en la posición 3 del núcleo cefalosporínico han ocasionado las diferencias esenciales entre las distintas aminotiazolil cefalosporinas, aumentando el espectro antimicrobiano y variando las características farmacocinéticas.

La cefepima mantiene la cadena acil lateral de la cefalosporinas de tercera generación en la posición 7, que le confiere una excelente actividad frente a *P. aeruginosa*; pero introduce un grupo amonio cuaternario mediante un grupo (1-metil-1-pirrolidino)-metil en la posición 3, que le confiere una gran capacidad de atravesar rápidamente los canales poralinas, proporcionándole una mayor actividad frente a microorganismos Gram positivos y a *Enterobacteriaceae*, que la que posee la cefotaxima y ceftazidima [55-59].

En la Figura 1.4 aparece representado la estructura química de la cefepima, cuyo nombre químico es 7-[a-(2-amino-4-tiazol-4-il)-a-(z)metoxiiminoacetamido]-3-[(1-metil-1-pirrolidino)-metil]-3-cefem-4-carboxilato, presentando un peso molecular de 480.56 y un aspecto de polvo seco de color blanco.

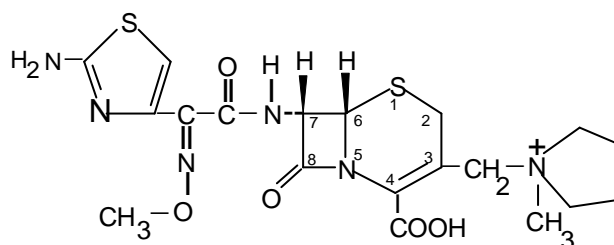


Figura 1.4. Estructura química de la cefepima.

### **1.2.2.- MECANISMO DE ACCION**

Los antibióticos betalactámicos ejercen su acción al interactuar con un grupo de proteínas que se encuentran en la membrana celular bacteriana y que reciben el nombre de proteínas de unión a penicilina (PBP). Son enzimas que, por una parte, catalizan la biosíntesis del peptidoglicano de la pared de la célula bacteriana y, por otra, son diana de acción de los antibióticos betalactámicos que producen la acilación de determinadas PBP e interrumpen la síntesis de la pared celular originando la lisis y muerte celular [55].

En las bacterias Gram positivas, los betalactámicos difunden a través del peptidoglicano de la pared celular y se conjugan con las PBP inhibiendo la síntesis de la pared celular y causando finalmente su lisis. En las bacterias Gram negativas, las PBP se localizan en una membrana celular más interna rodeadas por el espacio periplásmico y la membrana celular externa. El antibiótico tiene que atravesar, en primer lugar, la membrana celular externa por los canales porinas y una vez que alcanza el espacio periplásmico, las enzimas denominadas betalactamasas, localizadas en dicho espacio, tienen la posibilidad de conjugarse con él hidrolizándolo antes de que alcance las PBP diana.

Por tanto, la actividad de un antibiótico betalactámico frente a las bacterias Gram negativas depende de varios factores: 1) la tasa de penetración a través de la membrana bacteriana externa, 2) la interacción con las betalactamasas, y 3) la interacción con las PBP diana. Estos factores no actúan de modo independiente, sino que, en conjunto, contribuyen a determinar los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico betalactámico frente a los microorganismos Gram negativos [60]. En el diseño de los nuevos antimicrobianos se ha de tener en cuenta la importancia de la interrelación de estos tres factores [61].

#### **1.2.2.1.- Penetración a través de la membrana bacteriana externa.**

La tasa de penetración a través de la membrana bacteriana externa es uno de los factores determinantes de la actividad antimicrobiana de los antibióticos betalactámicos. La rápida penetración al interior de la célula garantiza una concentración de antibiótico

en el espacio periplásmico suficientemente elevada como para unirse a las PBP antes de que las betalactamasas inactiven el antibiótico.

La cefepima atraviesa la membrana externa de los microorganismos Gram negativos con mayor rapidez que las cefalosporinas de segunda o tercera generación [62,63].

La tasa de penetración de la cefepima se relaciona con su tamaño, relativamente pequeño, su forma de proyectil y, fundamentalmente, con su configuración de ión anfótero. Los principales canales porínicos de muchas bacterias Gram negativas son selectivos para los cationes. La carga positiva de la cadena lateral de amonio cuaternario de la cefepima (resultando una molécula zwitteriónica) facilita la orientación de la estructura química a la entrada de la porina, mientras que la configuración de ión anfótero posibilita una rápida penetración a través de la membrana externa. Además, la estructura química confiere a la cefepima un carácter hidrófilo que determina que el antibiótico se mueva con facilidad en el interior del espacio periplásmico. En conjunto, estas propiedades permiten disponer de una concentración elevada de cefepima en el espacio periplásmico, suficiente para ejercer su acción antibacteriana [64,65].

#### **1.2.2.2.- Interacción con las betalactamasas**

La cefepima es esencialmente resistente a las betalactamasas por dos razones: en primer lugar por tener su molécula poca afinidad por estas enzimas y en segundo lugar porque su mayor velocidad de penetración hasta el espacio periplásmico determina una concentración de moléculas alta y, consecuentemente, es más difícil de inactivar por las betalactamasas. Como se ha comentado anteriormente, la cefepima posee un radical aminotiazolil-oxiimino en la posición 7 del núcleo cefalosporínico que le confiere una gran estabilidad frente a las betalactamasas de las bacterias Gram negativas. Además, en posición 3 tiene un radical N-metil-pirrolidina que incrementa su actividad frente a las enterobacterias que producen betalactamasas cromosómicas inducibles [66].

La cefepima posee una elevada estabilidad frente a la mayoría de las betalactamasas plasmídicas y cromosómicas con excepción de un reducido número de enzimas que la inactivan, concretamente las especies de *Bacteriodes*. Sin embargo, la



ventaja mayor de la cefepima respecto de cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima radica en su menor afinidad y tasa de hidrólisis por las betalactamasas cromosómicas inducibles del grupo 1 de Bush, que redundan en una menor capacidad de seleccionar mutantes con nivel de resistencia elevado [62,64,65]. Así se explica la superior actividad de la cefepima frente a muchos organismos Gram negativos multirresistentes, en especial *Enterobacter*, *Citrobacter* y *P. aeruginosa*. También hay que destacar su elevada estabilidad frente a betalactamasas del tipo TEM-1, TEM-2 y SHV-1 correspondientes al grupo 2b de Bush [67].

### **1.2.2.3.- Interacción con las proteínas diana de unión a la penicilina**

Las proteínas de unión a la penicilina (PBP), y por extensión al resto de los betalactámicos, se clasifican según su peso molecular, siendo la PBP 1 la de mayor tamaño. La mayoría de las PBP son de bajo peso molecular, y generalmente no son vitales para el crecimiento o la supervivencia. En general, las PBP esenciales son las de mayor peso molecular (PBP 1, PBP 2, PBP 3). Como la mayoría de las cefalosporinas previas, la cefepima se une firmemente a la PBP 3 de los microorganismos Gram negativos [68]. Sin embargo, a diferencia de algunas cefalosporinas anteriores, interacciona también con las PBP 1a, 1b y 2, y de su elevada afinidad por estas dos PBP diana, cabe esperar una eficaz acción bactericida [69]. Por otra parte, es de gran importancia la afinidad de la cefepima por la PBP 2, toda vez que el reducido número de moléculas de esta enzima a saturar en la membrana celular requiere un menor número de moléculas del antibiótico. La afinidad de la cefepima por la PBP 2 contribuye, así mismo, a su efecto bactericida frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes [70].

### **1.2.3.- MICROBIOLOGÍA**

La cefepima posee un amplio espectro antimicrobiano con una excelente actividad intrínseca frente a la mayoría de los microorganismos habitualmente causantes de patología infecciosa.

Frente a los microorganismos Gram positivos, la cefepima ofrece un amplio espectro de actividad, prácticamente superponible al de la cefotaxima, en el que se

incluye *Staphylococcus sensible a la meticilina*, *S.pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. bovis* y *S. pneumoniae*. Por el contrario, muestra baja actividad en *Enterococcus* y es inactiva, como el resto de los antibióticos betalactámicos, frente a *Staphylococcus resistentes a la meticilina*.

Con respecto a los microorganismos Gram negativos, la cefepima muestra una elevada actividad en *Enterobacteriaceae*, incluyendo aislamientos de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella* y *Serratia* resistentes a cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima por hiperproducción de betalactamasa cromosómica inducible. Además, la cefepima tiene una actividad similar a la de la ceftazidima frente a *P. aeruginosa* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores, con la excepción de *Xanthomonas maltophilia*, por otra parte resistente a los antibióticos betalactámicos. Así mismo, la actividad de la cefepima es muy elevada frente a *Haemophilus*, *Moraxella* y *Neisseria* y otros microorganismos exigentes en sus condiciones de crecimiento.

Por el contrario y remedando a otras aminotizolil cefalosporinas, el espectro de actividad de la cefepima frente a las bacterias anaerobias es más reducido y aunque incluye *Fusobacterium*, *Peptoestreptococcus* y *Clostridium perfringens*, carece de actividad valorable clínicamente frente a *B. fragilis* y *C. difficile*.

En las tablas 1.6 y 1.7 se recogen los datos más significativos de la actividad *in vitro* de la cefepima, expresados como CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub>, comparativamente con las de la ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e imipenem [71].

Tabla 1.6. Actividad *in vitro* comparativa de la cefepima con otros antibióticos frente a Gram negativos.

Microorganismos (n° de aislamientos)	Antibiótico	CMI (µg/ml)	
		50%	90%
<i>Escherichia coli</i> (527)	Cefepima	0.03	0.06
	Ceftazidima	0.12	0.5
	Cefotaxima	0.06	0.12
	Ceftriaxona	0.03	0.06
	Imipenem	0.12	0.25
<i>Proteus mirabilis</i> (144)	Cefepima	0.06	0.12
	Ceftazidima	0.06	0.12
	Cefotaxima	0.03	0.06
	Ceftriaxona	0.015	0.06
	Imipenem	0.5	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (168)	Cefepima	0.03	0.12
	Ceftazidima	0.12	0.5
	Cefotaxima	0.03	0.25
	Ceftriaxona	0.03	0.12
	Imipenem	0.12	0.5
<i>Klebsiella oxytoca</i> (42)	Cefepima	0.03	0.06
	Ceftazidima	0.12	0.25
	Cefotaxima	0.03	0.12
	Ceftriaxona	0.03	0.12
	Imipenem	0.12	0.25
<i>Providencia stuartii</i> (10)	Cefepima	0.03	1
	Ceftazidima	0.25	1
	Cefotaxima	0.12	4
	Ceftriaxona	0.03	2
	Imipenem	0.12	2
<i>Enterobacter aerogenes</i> (36)	Cefepima	0.03	0.5
	Ceftazidima	0.25	32
	Cefotaxima	2	16
	Ceftriaxona	0.12	32
	Imipenem	1	2

<i>Enterobacter cloacae</i> (100)	Cefepima	0.03	0.5
	Ceftazidima	0.25	4
	Cefotaxima	0.25	1
	Ceftriaxona	0.12	4
	Imipenem	0.25	1
<i>Citrobacter freundii</i> (30)	Cefepima	0.06	2
	Ceftazidima	0.5	128
	Cefotaxima	0.25	16
	Ceftriaxona	0.25	32
	Imipenem	0.5	1
<i>Citrobacter diversus</i> (18)	Cefepima	0.03	0.12
	Ceftazidima	0.12	0.5
	Cefotaxima	0.06	0.25
	Ceftriaxona	0.03	0.12
	Imipenem	0.12	0.5
<i>Morganella morganii</i> (33)	Cefepima	0.03	0.12
	Ceftazidima	0.25	2
	Cefotaxima	0.06	2
	Ceftriaxona	0.03	2
	Imipenem	2	4
<i>Serratia marcescens</i> (44)	Cefepima	0.12	0.5
	Ceftazidima	0.25	0.5
	Cefotaxima	0.25	4
	Ceftriaxona	0.5	4
	Imipenem	0.5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (237)	Cefepima	2	8
	Ceftazidima	2	8
	Cefotaxima	16	128
	Ceftriaxona	32	>128
	Imipenem	2	4
<i>Xanthomonas maltophilia</i> (32)	Cefepima	16	64
	Ceftazidima	64	>128
	Cefotaxima	128	>128
	Ceftriaxona	>128	>128
	Imipenem	128	>128

<i>Acinetobacter anitratus</i> (54)	Cefepima	4	32
	Ceftazidima	8	32
	Cefotaxima	16	128
	Ceftriaxona	16	128
	Imipenem	0.25	1
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (54)	Cefepima	1	4
	Ceftazidima	2	8
	Cefotaxima	4	8
	Ceftriaxona	4	8
	Imipenem	0.12	0.25
<i>Haemophilus influenzae</i> <i>β-lactamasa negativa</i> (63)	Cefepima	0.06	0.06
	Ceftazidima	0.06	0.12
	Cefotaxima	0.015	0.015
	Ceftriaxona	≤0.007	≤0.007
	Imipenem	0.5	1
<i>Haemophilus influenzae</i> <i>β-lactamasa positiva</i> (13)	Cefepima	0.06	0.12
	Ceftazidima	0.06	0.12
	Cefotaxima	0.015	0.015
	Ceftriaxona	≤0.007	0.015
	Imipenem	0.5	1
<i>Moraxelia catarrhalis</i> <i>β-lactamasa positiva</i> (19)	Cefepima	0.25	1
	Ceftazidima	0.03	0.25
	Cefotaxima	0.12	0.5
	Ceftriaxona	0.06	0.5
	Imipenem	0.015	0.03

Tabla 1.7. Actividad *in vitro* comparativa de la cefepima con otros antibióticos frente a Gram positivos.

Microorganismos (nº de aislamientos)	Antibiótico	CMI (µg/ml)	
		50%	90%
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>sensibles a la meticilina</i> (472)	Cefepima		4
	Ceftazidima	8	16
	Cefotaxima	2	4
	Ceftriaxona	4	4
	Imipenem	0.015	0.03
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>resistentes a la</i> <i>meticilina</i> (38)	Cefepima	>128	>128
	Ceftazidima	>128	>128
	Cefotaxima	>128	>128
	Ceftriaxona	>128	>128
	Imipenem	32	64
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>sensibles a la meticilina</i> (128)	Cefepima	0,5	4
	Ceftazidima	4	16
	Cefotaxima	1	8
	Ceftriaxona	1	16
	Imipenem	0.015	0.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>resistentes a la</i> <i>meticilina</i> (48)	Cefepima	16	32
	Ceftazidima	16	64
	Cefotaxima	16	>128
	Ceftriaxona	16	128
	Imipenem	2	32
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (46)	Cefepima	4	>128
	Ceftazidima	32	>128
	Cefotaxima	8	>128
	Ceftriaxona	16	>128
	Imipenem	0.03	128
<i>Staphylococcus simulans</i> (10)	Cefepima	1	4
	Ceftazidima	8	32
	Cefotaxima	2	4
	Ceftriaxona	4	8
	Imipenem	0.03	0.06
<i>Corynebacterium spp.</i> (16)	Cefepima	0.25	1
	Ceftazidima	8	32
	Cefotaxima	0.5	8
	Ceftriaxona	1	8
	Imipenem	0.015	0.25

<i>Enterococcus faecalis</i> (248)	Cefepima	32	128
	Ceftazidima	>128	>128
	Cefotaxima	>128	>128
	Ceftriaxona	>128	>128
	Imipenem	0.5	2
<i>Enterococcus faecium</i> (30)	Cefepima	>128	>128
	Ceftazidima	>128	>128
	Cefotaxima	>128	>128
	Ceftriaxona	128	>128
	Imipenem	2	>128
<i>Streptococcus β-hemolítico del grupo A</i> (155)	Cefepima	0.015	0.03
	Ceftazidima	0.12	0.25
	Cefotaxima	0.015	0.03
	Ceftriaxona	0.015	0.03
	Imipenem	≤0.007	0.015
<i>Streptococcus β-hemolítico del grupo B</i> (82)	Cefepima	0.06	0.12
	Ceftazidima	0.5	1
	Cefotaxima	0.03	0.06
	Ceftriaxona	0.03	0.06
	Imipenem	0.015	0.03
<i>Streptococcus β-hemolítico del grupo G</i> (29)	Cefepima	0.03	0.03
	Ceftazidima	0.25	0.5
	Cefotaxima	0.015	0.03
	Ceftriaxona	0.03	0.06
	Imipenem	≤0.007	0.015
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (118)	Cefepima	0.03	0.12
	Ceftazidima	0.25	0.5
	Cefotaxima	0.015	0.06
	Ceftriaxona	0.015	0.06
	Imipenem	≤0.007	0.015
<i>Streptococcus mitis</i> (23)	Cefepima	0.06	2
	Ceftazidima	1	4
	Cefotaxima	0.06	2
	Ceftriaxona	0.06	1
	Imipenem	0.015	0.12
<i>Streptococcus sanguis</i> (27)	Cefepima	0.12	0.5
	Ceftazidima	1	2
	Cefotaxima	0.03	0.25
	Ceftriaxona	0.06	0.5
	Imipenem	0.015	0.06

#### 1.2.4.- CAPACIDAD PARA EL DESARROLLO DE RESISTENCIA

La utilización clínica de los antibióticos betalactámicos puede originar el desarrollo de resistencia *in vivo*, especialmente en el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos Gram negativos productores de betalactamasas cromosómicas inducibles: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*.

En estos microorganismos coexisten, habitualmente, dos poblaciones con diferente nivel de producción de betalactamasa. La población mayoritaria produce, en condiciones normales, una concentración de enzima baja o moderada cuyo nivel se puede incrementar por inducción como consecuencia de su exposición a concentraciones crecientes de betalactámico. Una segunda población, minoritaria, está formada por mutantes establemente desreprimidos en su producción de betalactamasas que producen elevadísimas concentraciones de enzima sin necesidad de inducción. El mecanismo inductivo da lugar a un aumento transitorio de la síntesis enzimática que sólo ocasionalmente origina la resistencia, mientras que la selección, por el tratamiento con betalactámicos, de mutantes establemente desreprimidos es el mecanismo fundamental de resistencia *in vivo* [70].

De la capacidad inductora de betalactamasas selectoras de mutantes establemente desreprimidos, así como de la estabilidad a la hidrólisis enzimática de cada betalactámico, depende su efectividad terapéutica. Algunas penicilinas, las cefamicinas y los carbapenems poseen un elevado poder inductor pero son poco selectores por su estabilidad a las betalactamasas cromosómicas inducibles, mientras que las cefalosporinas de tercera generación tienen un bajo poder inductor pero una elevada capacidad selectora de mutantes establemente desreprimidos, sobre todo en tratamientos prolongados. En este último aspecto podría radicar la ventaja esencial de la cefepima sobre otras aminotiazolil cefalosporinas previas, cefotaxima y ceftazidima, toda vez que sobre una capacidad inductora equiparable tiene una mayor estabilidad a la hidrólisis enzimática y mejor penetración al interior de la bacteria, con lo que el poder selectivo de mutantes altamente resistentes es mucho menor.



Diversos estudios experimentales confirman esta hipótesis previa sobre el potencial de inducción de resistencia de la cefepima y la capacidad de selección de mutantes multirresistentes. Se ha demostrado que la cefepima es un mal inductor de la producción de betalactamasa en *C. freundii*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa* así como en *S. marcescens* y *M. morgani* [69,72-74]. En comparación con la cefotaxima, ceftazidima y moxalactam, la cefepima mostró los valores de CMI más bajos frente a mutantes multirresistentes de *C. freundii*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa* [74]. Los estudios *in vitro* también han demostrado que la cefepima selecciona mutantes multirresistentes con menos frecuencia que las cefalosporinas de tercera generación. Además es infrecuente la resistencia a la cefepima entre los mutantes resistentes a ceftazidima y cefotaxima [72,73].

### 1.2.5.- FARMACOCINETICA

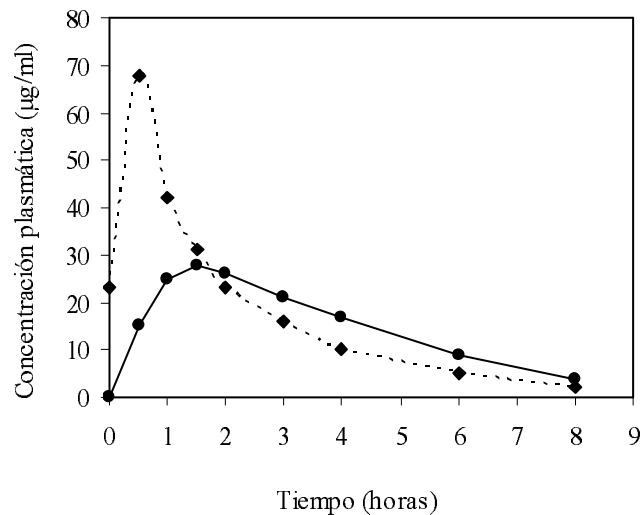
La cefepima tiene una cinética lineal (cinética de primer orden), presenta una buena distribución tisular, con lo que alcanza concentraciones eficaces en numerosos territorios orgánicos, y sus características farmacocinéticas permiten utilizar esquemas de dosificación cómodos.

#### 1.2.5.1.- Absorción

La cefepima únicamente puede utilizarse por vía intramuscular o intravenosa. Administrada por vía intravenosa a dosis entre 250 y 2000 mg en 24 voluntarios sanos, la concentración plasmática máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) ha oscilado entre  $16.3 \pm 2,4$  mg/l con 250 mg y  $133 \pm 35.5$  cuando se administran 2 g, existiendo siempre una relación directa entre la dosis administrada y la  $C_{\text{máx}}$  con un coeficiente de correlación de 0,99 según la ecuación  $C_{\text{máx}} = -0,56 \pm 0,066 \cdot \text{dosis}$ .

El área bajo la curva de concentraciones plasmáticas en función del tiempo (AUC) presenta valores que oscilan entre 34 y 263 mg h l<sup>-1</sup>, incrementándose también de una forma directamente proporcional a la dosis [75].

Cuando la cefepima se administra por vía intramuscular la absorción es prácticamente del 100%, alcanzándose la  $C_{m\acute{a}x}$ , en 1 a 1.6 h y cuyos valores son aproximadamente la mitad de las concentraciones observadas después de la infusión intravenosa de dosis equivalentes; no obstante, las áreas bajo la curva en ambas administraciones fueron prácticamente idénticas [76]. La cefepima muestra una cinética lineal, no dependiente de la dosis. En la Figura 1.5 se representa una comparación de las concentraciones plasmáticas de cefepima después de la administración por vía intravenosa e intramuscular de 1 g de cefepima.



*Figura 1.5.* Concentraciones plasmáticas de cefepima después de administrar por vía intravenosa (♦) e intramuscular (●) una dosis de 1g.

La administración de dosis múltiple no produce ningún efecto de acumulación y tampoco modifica los parámetros farmacocinéticos, aunque se prolonga de forma poco significativa la vida media de eliminación, que pasa de 2 a 2.4 horas [77-78].

### 1.2.5.2.- Distribución

La fijación a proteínas plasmáticas de la cefepima es relativamente baja, entre un 16% y un 19%; por tanto, la fracción libre es elevada, lo que facilita una amplia distribución a tejidos.

El volumen de distribución cuando se ha alcanzado el equilibrio estacionario se sitúa entre 19 y 22 litros y corresponde por lo tanto al compartimiento extracelular.

La cefepima ha demostrado una excelente penetración en los diversos tejidos y líquidos orgánicos. Las concentraciones obtenidas en orina, bilis, líquido peritoneal y de vesículas cutáneas, apéndice y vesícula biliar fueron próximas al 30% de las concentraciones logradas en el plasma después de la administración de dosis únicas de 2 g. La concentración en el esputo y en la próstata fue de 7.8 mg/ml y de 31.5 mg/g, respectivamente. El porcentaje de penetración en la mucosa bronquial después de una dosis única fue del 60% [79], mientras que en el líquido peritoneal y en el tejido apendicular, en pacientes que habían recibido 2 g cada 12 horas, fue del 74% y del 51%, respectivamente [80,81]. Se determinaron las concentraciones de cefepima en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes pediátricos afectados de meningitis, obteniéndose valores promedio del 10% de las concentraciones plasmáticas [82]. Por otro lado, los niveles de cefepima encontrados a nivel ocular (humor acuoso y vítreo) después de una administración intravenosa, están por debajo del  $CMI_{90}$  para la mayoría de los patógenos oculares [83,84].

### 1.2.5.3.- Eliminación

La eliminación de cefepima se realiza preferentemente a través del riñón, por medio de filtración glomerular. El aclaramiento corporal total de cefepima es de 122 a 155 ml/ min.

La vida media de eliminación es de 2 horas en voluntarios sanos y no es dependiente de la dosis.

Aproximadamente el 88% de la dosis administrada se elimina por orina sin modificar. El resto se elimina en forma de 3 metabolitos: la N-metil-pirrolidina N-óxido, el epímero-7 de cefepima y N-metil-pirrolidin, que representaron el 6.8, 2.5 y menos del 1%, respectivamente, de la dosis total administrada [78].

#### **1.2.5.4.- Farmacocinética en situaciones especiales**

##### **✓ Insuficiencia renal**

Dado el mecanismo de eliminación de cefepima a través fundamentalmente de filtración glomerular, sus características farmacocinéticas pueden modificarse en pacientes con insuficiencia renal.

El AUC de cefepima se incrementa a medida que se deteriora la función renal en relación directa con el aclaramiento de creatinina. El aclaramiento corporal total y por supuesto el aclaramiento renal de cefepima disminuyen también en relación directa con el deterioro progresivo de la función renal, y la vida media de eliminación, al igual que el tiempo medio de residencia, se prolongan progresivamente [85]. Por ello, se debe administrar cefepima a dosis menores o aumentar el tiempo entre dosis sucesivas a los pacientes con insuficiencia renal y valores de creatinina inferiores a 30 ml/min.

En pacientes sometidos a régimen de hemodiálisis se ha podido comprobar que después de una sesión de 3 horas el aclaramiento plasmático de cefepima es del 68% [86]. La vida media de eliminación de cefepima en los periodos interdiálisis es de 13.5 horas y pasa a ser de 2.3 horas durante la hemodiálisis.

##### **✓ Insuficiencia hepática**

Los estudios farmacocinéticos realizados en pacientes con hepatopatía, revelan que el volumen de distribución es el único parámetro que se afecta, aumentándose, aunque es clínicamente insignificante la variación resultante en las concentraciones

séricas [80]. Por tanto, no se precisan ajustes de la dosis de cefepima en el tratamiento de los pacientes con disfunción hepática.

#### ✓ **Farmacocinética en ancianos**

En conjunto, la cinética de cefepima en ancianos cambia poco en relación con los adultos jóvenes y únicamente el volumen de distribución y la vida media de eliminación pueden modificarse.

El volumen de distribución es mayor para los ancianos y la vida media de eliminación puede prolongarse hasta unas 3 horas debido fundamentalmente a una disminución del aclaramiento renal, que seguramente está en relación con el deterioro de la función renal que se produce en los ancianos.

Sin embargo, estos cambios no tienen significación clínica, por lo que no es necesario modificar los esquemas posológicos mientras el anciano mantenga una función renal normal para su edad [87].

#### **1.2.6.- REACCIONES ADVERSAS**

Las cefalosporinas figuran entre los antibióticos más seguros, siendo raras las complicaciones graves. No obstante, con todos los antibióticos betalactámicos está descrita la anafilaxia grave, aunque las reacciones de hipersensibilidad más frecuentes incluyen la fiebre y la aparición de erupciones cutáneas.

Los efectos gastrointestinales secundarios de las cefalosporinas son relativamente poco frecuentes y, en general, de escasa importancia. Se han descrito náuseas, vómitos, diarrea inespecífica y diarrea o colitis asociadas a antibióticos, siendo de mayor relevancia clínica la diarrea o colitis asociada a la toxina del *C. difficile*.

En general, las cefalosporinas poseen una escasa capacidad para producir neurotoxicidad, aunque se han notificado episodios de ansiedad, psicosis, delirio y confusión. Como con otros antibióticos betalactámicos se aumenta la probabilidad de convulsiones en los pacientes con insuficiencia renal tratados con dosis altas.

Las alteraciones de los parámetros de laboratorio asociadas al tratamiento con cefepima fueron relativamente infrecuentes y coincidentes con las descritas para otras cefalosporinas: eosinofilia, aumento de transaminasas y tiempo de protrombina, etc.

Las posibles modificaciones que cefepima pudiera producir sobre la flora fecal suponen una ligera disminución del número de *E. coli* en heces y un discreto aumento de *Bacteroides sp.* y *Chlostridium*. Estos niveles retornan a valores basales al cabo de 20 días de finalizar el tratamiento [88].

A continuación se reseñan los efectos secundarios por sistemas, relacionados con el tratamiento de cefepima. En los casos en que no se indica, la incidencia es menor del 1 %.

- ✓ Reacciones de hipersensibilidad: erupción (2,8%), prurito (1,3%), fiebre. La anafilaxia y reacciones de tipo anafiláctico poseen una frecuencia muy baja (0,1%).
- ✓ Sistema cardiovascular: dolor torácico, taquicardia.
- ✓ Síntomas gastrointestinales: diarrea (3,6%), náuseas (3,0%), vómitos (2,3%), estreñimiento (1,4%), dolor abdominal (1,2%), dispepsia.
- ✓ Sistema nervioso: cefalea (3,4%), ansiedad, confusión, mareo, parestesias, insomnio. Rara vez se notificaron convulsiones (>0,1%).
- ✓ Sistema respiratorio: tos, disnea, dolor de garganta.
- ✓ Sistema genitourinario: vaginitis.
- ✓ Otros: edema periférico, sudoración, astenia, dolor, dolor lumbar.

### 1.2.7.- INDICACIONES

Numerosos estudios clínicos indican que cefepima es un antibiótico útil como tratamiento de primera elección en infecciones graves y constituye una clara alternativa a las cefalosporinas de tercera generación disponibles. A continuación se revisará las indicaciones clínicas potenciales de la cefepima.

#### ✓ **Infección respiratoria**

La neumonía es probablemente la infección nosocomial más problemática, especialmente la que se asocia a respiración asistida, ya que presenta un alto índice de mortalidad e involucra bacterias multirresistentes. Las cefalosporinas de cuarta generación deben considerarse como tratamiento de inicio debido a su gran potencia frente a patógenos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Estudios en neumonía nosocomial [89,90], indican que la cefepima posee una prevalencia menor de cepas resistentes de *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* y cocos Gram positivos, una tasa de curación y erradicación mayor y una mejor relación costo-efectividad que ceftazidima. Cefepima también debe tenerse en cuenta en el tratamiento de pacientes hospitalizados por neumonía adquirida en la comunidad, particularmente en áreas de alta incidencia de *S. aureus* y/o *Enterobacteriaceae*. Así, un estudio comparativo [91] indica que cefepima posee una mayor tasa de erradicación que ceftriaxona.

#### ✓ **Sepsis y bacteriemia.**

El reconocimiento temprano de la infección y la instauración de un tratamiento antimicrobiano correcto son determinantes en el pronóstico de la sepsis, donde un estudio muestra que la mortalidad puede llegar al 50% en pacientes con sepsis graves o shock séptico. Además, en los últimos años se ha producido un aumento del número de casos de bacteriemia donde los Gram positivos han superado a los Gram negativos como agentes causales [92]. Esto hace que cefepima haya pasado a la primera línea en el tratamiento de estas infecciones.

✓ **Neutropenia febril**

La monoterapia, extendida en Estados Unidos, presenta como ventajas menor coste y menor toxicidad. Sin embargo, en Europa no es una práctica muy extendida a pesar de que estudios recientes [93] demuestran que la monoterapia continua siendo una aproximación terapéutica válida, con mortalidad de causa infecciosa de aproximadamente un 5% de los estudios. Varios ensayos muestran que la monoterapia con cefepima es más eficaz y segura que imipenem y ceftazidima en el tratamiento inicial de la fiebre en pacientes neutropénicos [94,95].

✓ **Infección urinaria complicada**

Cefepima es activa frente a la mayoría de microorganismos implicados en las infecciones urinarias. El programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY llevado a cabo en varios hospitales de Europa y América, pone de manifiesto que cefepima e imipenem poseen el más amplio espectro de cobertura entre los betalactámicos, y ampicacina el mayor entre los aminoglucósidos [96]. Otro dato importante, comprobado experimentalmente, es que cefepima penetra bien en la próstata [97].

✓ **Infecciones de piel y tejidos blandos**

En las infecciones polimicrobianas de piel y tejidos blandos, en las que debe esperarse la implicación de estafilococos meticilin-sensibles y bacilos gram-negativos, cefepima es una alternativa con garantías. Un estudio comparativo entre cefepima y ceftazidima indicó que en sobreinfecciones por enterococos y *Pseudomonas* se debe usar cefepima. Mientras que la ceftazidima se indica en superinfecciones por *Acinetobacter*, *S.\_aureus* y *Enterobacter* [98].

✓ **Infecciones intraabdominales**

La adición de un agente con actividad frente a anaerobios amplía el espectro de cefepima en el tratamiento de la infección intraabdominal, que generalmente tiene una etiología mixta, por aerobios y anaerobios. Así, la tasa de curación del binomio cefepima-metronidazol es mayor que en imipenem [99]. Cefepima, además de



ensayarse en profilaxis quirúrgica, se ha demostrado su eficacia en infecciones ginecológicas y que es una alternativa eficaz, que evita la toxicidad de los aminoglucósidos, en el tratamiento de la peritonitis de la diálisis peritoneal continua ambulatoria [100].

✓ **Infecciones biliares**

Cefepima no tiene indicación en la realización de la profilaxis antibiótica de la cirugía biliar; sin embargo por sus características microbiológicas, con un amplio espectro de acción, junto con su falta de nefrotoxicidad y a que alcanza altas concentraciones en vesícula biliar, puede ser una clara alternativa en el tratamiento de las infecciones establecidas de la vía biliar como la colecistitis aguda y la colangitis aguda, especialmente si se presenta en enfermos de edad avanzada o diabéticos [101].

✓ **Meningitis**

En meningitis, cefepima es una buena alternativa, si la evolución de las resistencias a algunos patógenos plantea problemas de fiabilidad con las cefalosporinas de tercera generación, gracias a su amplio espectro y a su excelente penetración en el líquido cefalorraquídeo. En este sentido, existen referencias de la buena respuesta clínica de cefepima únicamente en niños [102].

### **1.2.8.- UTILIDAD DE CEFEPIMA EN EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVO (UCI)**

La importancia de las infecciones varía según los distintos hospitales y Servicios de Medicina Intensiva (UCI). Los pacientes ingresan directamente en la UCI debido a complicaciones relacionadas con infecciones adquiridas en la comunidad, destacando entre las más frecuentes las neumonías, las meningitis y las infecciones urinarias. Otros pacientes, hospitalizados previamente, ingresan en la UCI por complicaciones relacionadas con infecciones nosocomiales, destacando entre ellas las neumonías secundarias a broncoaspiración, sepsis relacionadas con catéteres y las peritonitis por dehiscencias de suturas. Finalmente, otro grupo de pacientes adquieren nuevas infecciones en la UCI, en relación con la instrumentación y la alteración de las barreras

defensivas naturales, destacando entre éstas las neumonías relacionadas con ventilación mecánica, las infecciones urinarias asociadas con sonda uretral, las bacteriemias por catéteres vasculares y las bacteriemias primarias.

La etiología de estas infecciones varía de forma considerable en cada una de las situaciones anteriores y depende de tres variables principales: el lugar de adquisición de la infección, la localización o foco de la infección y las características individuales del paciente. En los últimos años se ha detectado un incremento progresivo de los patrones de resistencia de la mayoría de los patógenos causantes de infecciones, tanto comunitarias como nosocomiales, al tiempo que ha aumentado la gravedad de los pacientes críticos, así como la presencia de déficit inmunitarios, lo que se ha asociado con una aparición cada vez más frecuente de infecciones producidas por patógenos multirresistentes u oportunistas. Uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes que afecta a los bacilos Gram negativos, predominantes en las UCI, se relaciona con el desarrollo de betalactamasas cromosómicas de clase 1 que hidrolizan e inactivan a muchos antibióticos betalactámicos, en especial a las cefalosporinas de tercera generación [103].

El tratamiento antibiótico de los pacientes críticos se realiza en la mayoría de las ocasiones de manera empírica, por lo que es necesario el conocimiento previo de los patógenos endémicos en cada UCI, así como de sus patrones de resistencia y sensibilidad. De esta manera se pueden emplear aquellos antibióticos que reúnan entre sus características el ser activos frente a los patógenos que predominan en una determinada área, de acuerdo con la política de antibióticos de cada hospital. En este aspecto la cefepima, gracias a sus características, supone una importante alternativa en los tratamientos de algunas infecciones de los pacientes ingresados en UCI.

#### **1.2.8.1.- Características de las infecciones en la UCI**

Varios grandes estudios de prevalencia han analizado las infecciones presentes en las UCI de nuestro país, entre los que destaca el estudio de evolución de la prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles (EPINE), promovido por la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene [54]. Este estudio, que se realizó desde 1990 hasta 1999, presenta los resultados más

relevantes sobre la evolución de la prevalencia de las infecciones nosocomiales y comunitarias, de sus características de localización y de la etiología microbiana, de los principales factores de riesgos asociados y del uso de antibióticos en los hospitales españoles.

Se han declarado un total de 3.330 infecciones nosocomiales, lo que supone una prevalencia media de 24.2 infecciones por cada 100 enfermos, y la media de infecciones por enfermo no ha variado apenas en los años (entre 1.3 y 1.5), por lo que la prevalencia de enfermos con infección tampoco ha aumentado de forma significativa con el tiempo, manteniéndose entre un 22.5% y un 26.7%. Estas prevalencias exceden las descritas en el estudio europeo de prevalencia de infección hospitalaria en unidades de cuidados intensivos (EPIC) en el que obtienen una media de 20,6% [104].

Sin embargo, ha aumentado de forma significativa en los sucesivos estudios la prevalencia de infecciones comunitarias (11-15%) lo que traduce, junto con la media de edad en aumento, la mayor labilidad de los pacientes a estas infecciones y a sus complicaciones.

Las infecciones más frecuentes han sido las respiratorias (40-48% del total de infecciones), lo que supone que uno de cada seis enfermos ingresados tenía una infección de este tipo al realizar la encuesta de prevalencia. La segunda infección en frecuencia fue la bacteriemia (11-22%) y también aumentó, como las infecciones respiratorias, con los sucesivos estudios EPINE. Globalmente la infección urinaria ha sido el tercer tipo de infección, aunque las de otras localizaciones la precedían en los primeros años, pero después han perdido este puesto, al reducirse de forma significativa. Por último, las infecciones quirúrgicas han disminuido significativamente, lo que seguramente está en relación con la mejora en la profilaxis perioperatoria.

Las infecciones no hospitalarias más frecuentes también han sido las respiratorias (34-53%), con una tendencia alcista significativa. Las demás infecciones no hospitalarias han tendido a subir, pero su incremento no alcanzó la significación estadística.

Hay que destacar que, tanto en las infecciones nosocomiales como en las comunitarias, destaca por su mayor frecuencia la neumonía con un 20-29% del total de las infecciones.

La gravedad de los enfermos ingresados se puede apreciar a partir de las variables que se refieren al riesgo de tipo intrínseco o extrínseco de los pacientes de las UCIs y a otras dos variables, el riesgo de base y el número de diagnósticos.

Sólo el 8-20% de los enfermos estudiados no han tenido ningún factor de riesgo de tipo intrínseco (habiendo sufrido éstos 8-14% de infección hospitalaria) mientras que casi la mitad de los pacientes tenían dos o más factores de riesgo de tipo intrínseco, y se infectaron la mayoría (75-92%). Por otra parte, la práctica totalidad de los enfermos ingresados han tenido factores de riesgo de tipo extrínseco, e incluso más del 90% tienen dos o más de estos factores, y de ellos se han infectado del 48 al 73%. Todo lo cual indica lo importante que sería reducir al mínimo esta instrumentación para reducir el riesgo de infecciones.

El factor de riesgo intrínseco más frecuente ha sido el coma (35-48% de los ingresados) siguiéndole insuficiencia renal, diabetes y enfermedad pulmonar crónica. De los enfermos con los dos primeros factores se infectaron del 33 al 47%, mientras que de los que tenían diabetes o enfermedad pulmonar crónica, del 21 al 35% sufrieron infección hospitalaria. Otros factores de tipo intrínseco que se han dado con menor frecuencia (< 20%) han sido inmunodeficiencia, desnutrición y úlceras por presión, aunque se han asociado más a infección nosocomial, ya que se han infectado, por término medio, casi la mitad de estos enfermos. El incremento se debe a que todos estos factores modifican la respuesta inmunitaria a las infecciones y de ahí la mayor susceptibilidad de los enfermos que las padecen.

Respecto a los factores de riesgo de tipo extrínseco, los más frecuentes han sido cateterización central, ventilación mecánica y sonda urinaria cerrada, pues se han descrito en más de dos tercios de los enfermos ingresados, siguiéndole la cirugía (en algo más de la mitad). Sin embargo, su asociación con la infección hospitalaria ha sido menor (aproximadamente en un tercio de los casos) que a otro factor menos frecuente,

la nutrición parenteral, ya que aproximadamente la mitad de estos enfermos tuvieron infección hospitalaria. En el estudio europeo EPIC, cuatro de los siete factores que encuentran asociados con la infección hospitalaria han correspondido a factores de riesgo extrínseco: catéter venoso central, catéter arterial pulmonar, ventilación mecánica y sondaje urinario, lo que refrenda los datos obtenidos en el estudio EPINE.

Como se refirió anteriormente, la gravedad de los enfermos ingresados en las UCIs también se puede valorar a través de la clasificación del riesgo de base. Mediante la misma se observa que aproximadamente un cuarto de los enfermos tenían riesgo de base leve, de los cuales uno de cada siete tuvo infección hospitalaria, mientras que en un porcentaje similar de enfermos con riesgo de base grave se infectaron uno de cada tres. Ello permite afirmar que esta clasificación, aunque es menos específica que las anteriores para indicar el riesgo de infección, ya que indica riesgo de muerte (y además no se diseñó para enfermos de UCI), también puede servir para estandarizar antes de comparar diferentes enfermos, unidades, años, etc., o bien para diseñar, junto con los factores de tipo intrínseco y otras variables conocidas al ingreso en la unidad (sexo, edad, etc.), sencillos sistemas de puntuación que permitan valorar el riesgo de infección nosocomial en las UCI, y así poder concentrar mayores esfuerzos en estos pacientes, evitando en lo posible dicha complicación.

Algo similar puede comentarse sobre la variable que recoge el número de diagnósticos diferentes de cada enfermo, ya que aproximadamente el 25% tienen sólo un diagnóstico, infectándose uno de cada seis, mientras que la quinta parte de los enfermos tenían cuatro o más diagnósticos, y de ellos se infectaron más de un tercio (el doble que los anteriores).

También hay que destacar la alta positividad de los estudios microbiológicos realizados para el diagnóstico etiológico (76-82%), mientras que no se practicó este tipo de estudio en solamente el 4-8% de los casos. Se debe seguir insistiendo en la necesidad de pedir cultivos en toda sospecha de infección en UCIs, no sólo por la valoración más adecuada de la infección sino también para reducir en lo posible la terapia empírica (politerapia antibiótica) clásica en estas unidades, responsable de la selección de microorganismos multirresistentes.

Por lo anterior, los microorganismos típicos de las UCI suelen ser muy resistentes a los antimicrobianos y además su importancia aumenta al transcurrir los años. Así, el primer género, por su frecuencia mantenida en el tiempo, ha sido *Pseudomonas* (hasta el 21 % del total de infecciones, de las que la mayoría correspondieron a *P. aeruginosa*, 10-16%). *S. aureus no meticilín resistentes* ha sido el segundo microorganismo, pero si le sumamos los meticilín resistentes puede llegar a ser la primera especie (12-17%), por delante de *P. aeruginosa*. Este incremento, debido a los meticilín resistentes es particularmente notable en los últimos años, en los que asciende a la mitad de los diagnósticos de infección por esta especie microbiana. El tercer puesto en esta ordenación etiológica le corresponde a *E.coli* (5-8% del total), aunque si consideramos como un todo los *Staphylococcus coagulasa negativos* (*S. epidermidis* o no), éstos alcanzan la tercera posición (8-13%). Otro coco Gram positivo, el enterococo, ocupa una posición similar a la del *E. coli* (4°-5° puestos), con una frecuencia del 5 al 8% del total de infección hospitalaria con diagnóstico etiológico. A partir de 1993 se empezó a recoger de forma aislada *Acinetobacter baumannii*, un microorganismo "célebre" en la UCI por su resistencia a los antimicrobianos, y su frecuencia no ha hecho sino ascender desde esa fecha, ya que se comenzó describiendo como agente en el 0,5% de estas infecciones en 1993 y en el año 1999 ha aumentado a 8,5%. Por último, la selección antibiótica acaba permitiendo la proliferación de levaduras, y éstas se encuentran en el 7 y el 11 % de los diagnósticos.

#### **1.2.8.2.- Indicaciones de la cefepima en las infecciones graves en UCI**

La cefepima posee un conjunto de propiedades diferenciales con respecto a las cefalosporinas de tercera generación que la hacen especialmente interesante para el tratamiento de los pacientes críticos en los Servicios de Medicina Intensiva. Entre estas propiedades destaca su mayor velocidad de penetración a través de las paredes externas de los bacilos Gram negativos, su mayor afinidad por las PBP, su menor afinidad por las betalactamasas en el espacio periplásmico y su menor inducción de estas enzimas, lo que le confiere una mayor capacidad para erradicar las cepas mutantes que aparecen durante el tratamiento de las infecciones producidas por un gran número de bacterias en los pacientes críticos.

Las indicaciones en que la cefepima puede ser un antibiótico de primera elección y puede formar parte de los tratamientos empíricos se exponen seguidamente [105].

✓ **Neumonías e infecciones respiratorias de vías bajas adquiridas en la comunidad**

En los pacientes que reúnan las siguientes características:

*Infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)*

La aparición de neumonías bacterianas en pacientes VIH positivos ha aumentado en los últimos años, debido a que cada vez es más frecuente la profilaxis para las infecciones oportunistas (antifúngicos, antivirales, tuberculostáticos). En estos pacientes es frecuente la presencia de flora mixta, en la que están presentes *S. pneumoniae* y bacilos Gram negativos como *P. aeruginosa*. Cuando la neumonía se acompaña de insuficiencia respiratoria aguda, el tratamiento empírico debe iniciarse con un antibiótico activo frente a dichas bacterias, además de otros que sean activos frente a *P. carinii* si se sospecha este patógeno por la clínica o la radiología.

*Broncopatía crónica y bronquiectasias*

Los pacientes con enfermedad crónica respiratoria que reciben tratamiento con corticoides y/o en los que es frecuente la utilización de antibióticos por infecciones de repetición, pueden desarrollar neumonías o infecciones de vías aéreas bajas que cursen con insuficiencia respiratoria. En esta situación es frecuente que la etiología de la infección sea mixta, con participación de bacilos Gram negativos y *P. aeruginosa*, los cuales están presentes en estos pacientes en una proporción cada vez mayor.

*Neumonías de mala evolución en tratamiento con cefalosporinas de segunda (cefuroxima, cefonicid) o tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona) y eritromicina*

En ocasiones, pacientes ingresados en el hospital por una neumonía de la comunidad evolucionan de forma desfavorable y presentan en los siguientes días al

ingreso signos de insuficiencia respiratoria que obligan a intubación y ventilación mecánica. En estos casos se debe valorar el primer tratamiento como fracaso e iniciar un tratamiento de rescate que puede incluir una cefalosporina de cuarta generación asociada con aminoglucósidos y eritromicina.

En estas tres situaciones, cefepima (2g/8-12 horas) más amicacina (15 mg/kg/día) es una buena alternativa terapéutica, mejor que otras combinaciones utilizadas.

✓ **Infecciones respiratorias adquiridas en el hospital: neumonías, bronconeumonías y traqueobronquitis, adquiridas durante la ventilación mecánica**

Los patógenos predominantes son *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *A. baumannii*, y en la mitad de los casos se presentan formando parte de flora polimicrobiana. El tratamiento empírico se realiza con la asociación de dos antibióticos y se fundamenta, en cada UCI, en el conocimiento de los patógenos que son endémicos. En aquellos casos en que predominan *P. aeruginosa* y *S. aureus*, la asociación de cefepima (2 g/8 horas) con aminoglucósidos (amicacina, 15 mg/kg en monodosis) o quinolonas (ciprofloxacino, 400 mg/12 horas) es una alternativa de elección que mejora el espectro de las combinaciones anteriores en los casos de cepas endémicas resistentes a ceftazidima y ureidopenicilinas. Los carbapenemes deben reservarse, en los protocolos de tratamiento empírico, para los tratamientos de segunda elección, excepto en los casos en que predomine como cepa endógena *A. baumannii*, sensible a dichos antibióticos.

✓ **Neumonías de mala evolución con tratamiento previo que incluía cefalosporinas de tercera generación**

En estos casos, un tratamiento de rescate puede incluir una cefalosporina de cuarta generación asociada con aminoglucósidos o quinolonas. Es obligado realizar procedimientos invasores para obtener muestras de exudado bronquial que permitan identificar los patógenos causantes de la infección. Cuando exista la sospecha de bacterias anaerobias o el paciente presente un segundo foco de infección abdominal o en



partes blandas, debe asociarse un antibiótico anaerobicida o administrarse una ureidopenicilina o carbapenemes.

#### ✓ **Bacteriemias con o sin foco determinado**

El tratamiento empírico de un paciente con sospecha clínica de bacteriemia secundaria se inicia con una combinación de fármacos que cubran los patógenos más frecuentes como origen de la infección. La cefepima es de elección cuando el foco es respiratorio. Cuando no existe un foco conocido, las bacteriemias se asocian en la mayoría de los casos con flora cutánea, en que predomina *S. epidermidis*, o con flora entérica (enterobacterias), y el tratamiento debe incluir un glucopeptido (vancomicina o teicoplanina) asociado con un antibiótico con cobertura frente a las enterobacterias. En los hospitales en que existen cepas endémicas con patrones de resistencia elevados frente a ceftazidima, monobactámicos o ureidopenicilinas, la cefepima es una alternativa que, asociada con glucopeptidos, supone un tratamiento de mayor seguridad.

#### **1.2.9.- FICHA TÉCNICA DE CEFEPIMA**

Según la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento, y más concretamente en el artículo 16 de garantías de identificación: denominación de las especialidades farmacéuticas, se indica que en la ficha técnica figurará la Denominación Oficial Española, claramente destacada, de las sustancias medicinales que contengan la especialidad farmacéutica o, en su defecto, la Denominación Común Internacional o la denominación común usual o científica. Además, en el artículo 17 de la mencionada ley de garantías de identificación: declaración de la composición, en la ficha técnica figurará, entre los datos de identificación, la completa y exacta composición cualitativa y cuantitativa, incluyendo no solo las sustancias medicinales, sino también todos los excipientes y los disolventes, aunque estos últimos desaparezcan en el proceso de fabricación.

En el artículo 19 de garantías de información: ficha técnica, etiquetado y prospecto, se indica que el titular de la especialidad farmacéutica proporcionará información escrita suficiente sobre su identificación, indicaciones y precauciones a observar en su empleo. La ficha técnica resumirá la información científica esencial

sobre la especialidad a que se refiere, y será difundida a los médicos y farmacéuticos en ejercicio y, en su caso, a los veterinarios en ejercicio, por el titular de la autorización, antes de la comercialización de la especialidad farmacéutica. Según este artículo, la ficha técnica se ajustará a un modelo uniforme, y en ella constará datos suficientes sobre identificación y su titular, así como la información que requiera una terapéutica y atención farmacéutica correcta, de acuerdo con los estudios que avalan su autorización. A la ficha técnica acompañará, preceptivamente, información actualizada del precio de la especialidad, y, cuando sea posible, la estimación del coste del tratamiento. Además, de contener información concerniente a la especialidad farmacéutica, podrá contener información de otras dosificaciones o vías de administración del mismo medicamento.

La información que proporcione la ficha técnica, especialmente a la que se refiere a indicaciones, contraindicaciones, efectos adversos y precauciones particulares en su empleo, deberá ser congruente con los resultados de los estudios farmacológicos y clínicos y con el estado presente de los conocimientos científicos. También deberá reflejar la experiencia adquirida con la especialidad farmacéutica desde su comercialización. Las afirmaciones que contengan estarán, en todo caso, apoyadas por estudios científicos y no serán desorientadoras para los profesionales sanitarios o el público.

Los textos y demás características de la ficha técnica han de ser previamente autorizados por el Ministerio de Sanidad y consumo, al igual que sus posibles modificaciones.

De esta forma, y considerando que la ficha técnica es el único documento técnico y que da fe del medicamento, se incluye a continuación la ficha técnica de la cefepima.



### **1.3.- MÉTODOS INSTRUMENTALES APLICADOS EN EL ANÁLISIS DE LAS CEFALOSPORINAS**

No cabe duda, que el medicamento es uno de los bienes más importantes dentro del sistema sanitario de cualquier país. Sin embargo, esta desmesurada confianza que parece tener la sociedad en el medicamento, puede acarrear graves consecuencias debido a un mal uso del mismo. De ahí, la necesidad de controlar el producto antes y después de su comercialización. Es aquí donde juega un importante papel el análisis de fármacos a través de métodos instrumentales.

Las técnicas instrumentales aplicables al análisis cualitativo y cuantitativo de antibióticos son necesarias en tres áreas fundamentales.

En primer lugar, en la industria farmacéutica es primordial disponer de un sistema analítico que detecte, identifique y cuantifique los productos obtenidos en los programas de investigación destinados a la obtención de un nuevo compuesto con actividad farmacológica.

El segundo campo de aplicación se encuentra en el área clínica, tanto en los estudios farmacocinéticos de un nuevo fármaco, como en la monitorización de los niveles séricos de aquellos principios activos con un bajo índice terapéutico.

En tercer lugar, las técnicas instrumentales son de un indudable interés debido a la información que aportan sobre la estructura de la molécula, presencia de contaminantes y productos de degradación, actividad, propiedades fisicoquímicas, etc... Por este motivo, se considera indispensable en la investigación de la pureza, identidad y estabilidad del compuesto, toxicidad del mismo y dentro del marco legal.

A continuación, se relacionarán las técnicas instrumentales utilizadas en esta memoria y descritas en la bibliografía, aplicadas al análisis de las cefalosporinas.

### 1.3.1.- ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

El espectro de absorción ultravioleta-visible de cada una de las cefalosporinas, se puede utilizar para la identificación de la molécula y para su cuantificación.

La absorción a longitudes de ondas próximas a 262 nm se ha atribuido al grupo cromóforo del anillo  $O=C-N-C=C-$ . Cuando se abre el anillo por un mecanismo hidrolítico disminuye la absorbancia a esta longitud de onda y puede desaparecer cuando la hidrólisis es total. Este máximo puede estar desplazado por la presencia en la molécula de sustituyentes capaces de producir un efecto batocrómico e hipsocrómico sobre el mismo. Además de esta banda de absorción, aquellas cefalosporinas que poseen otros grupos cromóforos como los contenidos en los anillos tienilo, tetrazol, aminotiazol, presentan los máximos correspondientes a los cromóforos citados. En la Tabla 1.8 figuran las longitudes de onda de máxima adsorción ultravioleta que presenta algunas cefalosporinas en solución acuosa.

Tabla 1.8. Longitudes de onda de máxima absorción que presentan las cefalosporinas por espectrofotometría ultravioleta

Cefalosporina	(nm)
Cefaclor	265
Cefacetrilo	260
Cefadroxilo	264
Cefalexina	260
Cefalodirina	240-255
Cefalotina	240-265
Cefamandol	270
Cefapirina	260
Cefazolina	270
Cefmetazol	272
Cefonicid	266
Cefoperazona	262
Cefotaxima	234-245
Cefoxitina	235-262
Cefradina	260
Ceftazidima	256
Ceftizoxima	233-294
Ceftriaxona	242-272
Cefsulodina	264
Cefuroxima	275

Esta técnica se ha utilizado ampliamente en el control de estos antibióticos, bien por determinación directa de la absorbancia de la molécula o mediante la determinación de otros grupos cromóforos obtenidos por tratamiento previo de la muestra en condiciones controladas de pH y temperatura [106]. No obstante, este procedimiento analítico puede perder especificidad por la interferencia que produce la contaminación de síntesis y determinados productos de degradación que se originen en el propio tratamiento de la muestra.

Otro método muy difundido en el análisis de cefalosporinas es la determinación espectrofotométrica con el reactivo hidroxilamina. Su fundamento es la ruptura del anillo  $\beta$ -lactámico producida por la hidroxilamina en unas condiciones de pH establecidas para cada molécula y la formación del ácido hidroxámico correspondiente que posteriormente forma un complejo coloreado con el ion férrico.

Otros métodos consisten en la determinación de ciertas cefalosporinas mediante la oxidación de las mismas con distintos reactivos [107,108], o mediante la formación de distintos complejos coloreados con el ión paladio [109] o con hierro [110].

En el caso de mezclas de moléculas que presentan solapamiento de las bandas de absorción, se ha recurrido a la primera y segunda derivada del espectro, lo cual permite un análisis preciso, rápido y sensible de preparaciones multicomponentes [111-113].

### 1.3.2.- MÉTODOS POLAROGRÁFICOS

La mayoría de las cefalosporinas experimentan electroreducción en electrodos de mercurio. Sin embargo, el grupo electroactivo puede involucrar diferentes partes del anillo  $\beta$ -lactámico (Figura 1.6). De esta forma, podemos clasificar a las cefalosporinas de la siguiente forma [114]:

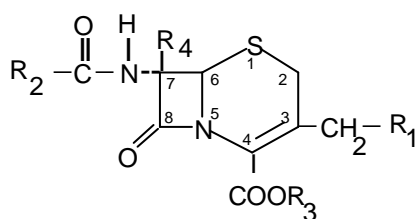
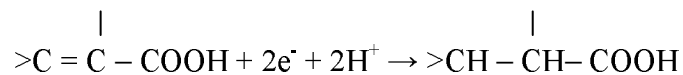
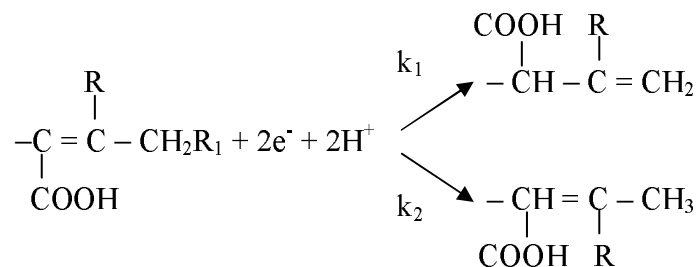


Figura 1.6. Estructura del anillo betalactámico.

- ✓ Cefalosporinas sin un grupo electroactivo en la cadena del C7 y con un radical alquilo en C3: en este grupo se incluyen cefalosporinas como cefadroxilo, cefalexina y cefradina, las cuales sufren una reducción con dos electrones del doble enlace C<sub>3</sub>=C<sub>4</sub>, que en medio ácido, se produce a un potencial ligeramente mas positivo que la reducción del electrolito soporte usado y que produce una sola onda. Por otro lado, la intensidad de corriente disminuye al aumentar el pH (por encima de 2.5).

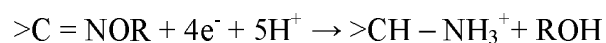


- ✓ Cefalosporinas con un grupo no reducible en la cadena de C7 y con un buen grupo saliente en C3: se incluye cefalotina y cefacetrilo. La naturaleza del grupo R<sub>1</sub> influye de manera decisiva sobre el proceso de reducción.

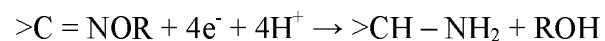


- ✓ Cefalosporinas con un grupo reducible en la cadena de C7 y un buen grupo saliente en C3: cefoperazona, cefoxitina, cefuroxima, cefotaxima, ceftriazona, cefotian, cefmetazol, cefamandol y ceftazidima. Entre las cefalosporinas más estudiadas de este grupo destacan aquellas que poseen un grupo alquiloimino en C7. En este grupo se incluye a la cefepima. Estas cefalosporinas se reducen produciendo dos ondas: una a potenciales más positivos correspondiente a la reducción, con cuatro electrones, del grupo anteriormente citado; y otra correspondiente al enlace C-R<sub>1</sub> donde intervienen dos electrones, a potenciales más negativos.





A valores más altos de pH:



- ✓ Cefalosporinas con un grupo reducible en la cadena de C7 y con un grupo alquilo o hidrógeno en C3: cefetamet y ceftizoxima poseen un grupo metoxiimino en C7 que se reduce tal y como se describió en el anterior grupo. En cuanto a la reducción del grupo del C3 no presenta ninguna onda.
- ✓ Cefalosporinas con un grupo no reducible en C7, pero con un buen grupo saliente en C3, donde además presenta otro centro electroactivo. Cefsulodina presenta tres ondas de reducción: la primera debida a la reducción del grupo N-alquilisonicotamida; la segunda debida a el enlace C-N del C3; y la tercera reducción es debida a un compuesto alcohólico producido en la segunda reducción.

En la Tabla 1.9 se recoge algunas características del comportamiento polarográfico de algunas cefalosporinas [115-120].



### **1.3.3.- VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ADSORTIVA**

La adsorción de las cefalosporinas, o de cualquiera de los productos de degradación obtenidos en medio ácido o básico, pueden acumularse en la superficie del electrodo. Cuando estas sustancias son adsorbidas en el electrodo se puede conseguir un aumento de la sensibilidad de la técnica voltamperométrica de varios órdenes de magnitud.

Las formas oxidadas de las cefalosporinas son adsorbidas en electrodos de mercurio. Los ácidos conjugados de estos compuestos, los cuales son formados a valores de pH inferiores a 8, son adsorbidas entre 0 y -0.2 V y redisueltas a -1 y -1.2 V. La base conjugada, reducida a pH mayor que 9, es más difícilmente adsorbida.

Las condiciones de redisolución de algunas cefalosporinas están recogidas en la Tabla 1.10 [114,121-123].



### 1.3.4.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Tradicionalmente, el método microbiológico se ha utilizado para establecer la actividad de estos principios activos en fluidos biológicos. Sin embargo, esta técnica presenta dos importantes inconvenientes como son, su baja especificidad que se pone de manifiesto en pacientes tratados con varios principios activos o en aquellas muestras en las que están presentes metabolitos, y que requiere un periodo de incubación largo.

Durante las décadas de los setenta y ochenta se desarrolló la cromatografía líquida de alta eficacia que introducía importantes mejoras como sensibilidad, precisión y especificidad. Esto hizo que, junto a ser una técnica rápida, se empleara en estudios farmacocinéticos de gran cantidad de principios activos.

Las características estructurales de las cefalosporinas hacen que estos antibióticos constituyan un grupo idóneo para su análisis por métodos cromatográficos. Por su naturaleza lipofílica, estas moléculas presentan una buena retención en las columnas y las distintas cadenas laterales unidas al anillo  $\beta$ -lactámico facilitan la resolución cromatográfica de estos compuestos. Las cefalosporinas que poseen sustituyentes muy polares son separadas por cromatografía de cambio iónico. Por otro lado, las cefalosporinas con sustituyentes poco polares, como pueden ser grupos alquilo y halógenos, son usadas preferentemente en cromatografía de fase reversa. La mayoría de las cefalosporinas se determinan por cromatografía de fase reversa debido a la gran estabilidad que presentan los rellenos hidrocarbonados ( $C_8$  y  $C_{18}$ ) de la fase estacionaria de este tipo de cromatografía. La retención cromatográfica de las cefalosporinas va a depender principalmente de los sustituyentes en C3 y C7, pero también de un complejo mecanismo donde están involucrados al mismo tiempo el pH, el  $pK_a$  y la fuerza iónica de la fase móvil [124,125].

Los fluidos biológicos son mezclas muy complejas de sustancias (proteínas, lípidos,...) que pueden deteriorar alguna parte del sistema cromatográfico o que pueden producir interferencias; por ello, se hace necesario tratar la muestra antes de su inyección en la columna. Este tratamiento consiste en la dilución de la muestra, precipitación de proteínas y extracción del fármaco.

La dilución de las muestras se suele realizar en aquellos fluidos con baja cantidad de proteínas como en orina, bilis y líquido cefalorraquídeo. La dilución se suele realizar con agua o con un tampón apropiado. Hay que destacar que, en muchos casos, las muestras de líquido cefalorraquídeo son directamente inyectadas sin previo tratamiento [126].

La precipitación proteica es un método bastante extendido debido a su simplicidad. Sin embargo, posee algunos inconvenientes de dilución de la muestra, de incompletas precipitaciones, de precipitación de otras sustancias distintas al analito y de una hidrólisis ácida, en el caso en que se use ácidos (ácido tricloroacético y ácido perclórico son los mas usados) para la precipitación. En otras ocasiones se usan sustancias alcohólicas, normalmente etanol o metanol, que pueden producir una leve disminución en la resolución debido a un ensanchamiento del pico. Acetonitrilo es otra sustancia precipitante que se usa con mucha frecuencia. La dilución de la muestra en la precipitación produce una disminución de la sensibilidad. Este problema se soluciona en muchas ocasiones usando, posteriormente a la precipitación, un disolvente orgánico como diclorometano, que extrae el resto de precipitante, concentrándose la cefalosporina en el sobrenadante.

Algunas cefalosporinas son previamente aisladas por adsorción en resinas de intercambio iónico y posterior elución. En estos casos la interacción de la cefalosporina con el empaquetamiento de la columna es mucho mayor que la que posee con las proteínas. Este método alarga la vida de las columnas cromatográficas y logra una preconcentración de la muestra.

La mayoría de los trabajos publicados describen la determinación de estos antibióticos en muestras de origen biológico, tanto en la realización de estudios farmacocinéticos como en la monitorización de niveles séricos. En la Tabla 1.11 se recoge las determinaciones cromatográficas de algunas de las cefalosporinas [127-133].

También hay que destacar algunos artículos que separan las distintas cefalosporinas mediante cromatografía líquida de alta eficacia y posteriormente utilizan un detector electroquímico como alternativa a la detección ultravioleta, donde fijando el potencial se realiza una medida amperométrica [134-135].







### 1.3.5.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS SOBRE MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA

La búsqueda exhaustiva de la bibliografía relacionada con la cefepima revela que la técnica más utilizada para su determinación es la cromatografía líquida de alta eficacia. A continuación se hace un breve resumen de los distintos métodos analíticos para la determinación de cefepima junto con la aplicación, si es el caso, que cada autor le ha dado al análisis de dicho principio activo en distintos fluidos biológicos.

#### ✓ **Cromatografía líquida de alta eficacia**

Claudine E. Fasching y col. [136] describen en 1986 la determinación de cefepima en muestras de suero humano y en ratas empleando una columna microBondapak C<sub>18</sub>, ácido acético a pH 2.8 y acetonitrilo en agua al 5% como fase móvil, un flujo de 2 ml/min y detección espectrofotométrica a 275 nm. Comparan dos métodos de extracción, uno donde utiliza metanol y ácido acético, y otro donde usa metanol exclusivamente. Demuestran que con el primer método se obtienen mejores porcentajes de recuperación (93%), con una linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 0.625 y 80 µg/ml y un límite de detección de 1 µg/ml.

Barbhaiya, R.H. y col. [137] describen en 1987 la determinación de cefepima en muestras de plasma y de orina en ratas. En el caso del plasma utilizan acetonitrilo y ácido tricloroacético para la precipitación de las proteínas, seguida de una extracción con acetonitrilo y diclorometano. La orina la diluyen con un tampón ácido acético/acetato sódico de pH 4.25. La detección espectrofotométrica la realizan a 280 nm. El objetivo del estudio es obtener parámetros farmacocinéticos.

Jehl, F. y col. [138] describen en 1997 la determinación de cefepima en muestras de suero humano empleando una columna Ultrasphere XL-ODS, acetato amónico 20 mM en acetonitrilo 7% y ajustando el pH a 2.8 con ácido acético como fase móvil, un flujo de 1 ml/min y detección espectrofotométrica a 254 nm. El método de extracción usado consiste en el uso de acetonitrilo como precipitante de proteínas seguido de una extracción con diclorometano (106% de recuperación), con una linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 0.1 y 50 µg/ml y un límite de detección de

0.1 µg/ml. Demuestran que la cefepima en agua es estable al menos durante 24 horas a 4°C, y estable en suero durante 6 horas a la misma temperatura, aunque sufre una importante degradación después de 24 horas en estas condiciones, por lo que proponen que se conserve a -80°C.

Danièle Barthes y col. [139] describen en 1997 la determinación de cefepima en diferentes soluciones empleando una columna Lichrocart 100-RP-18, acetonitrilo y tampón ácido acético/acetato sódico de pH 4.8 en la proporción 10:90 como fase móvil, un flujo de 1 ml/min y detección espectrofotométrica a 257 nm, con una linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 20 y 120 µg/ml y un límite de detección de 0.1 µg/ml. Demuestran que cefepima es estable en una solución de cloruro sódico al 0.9% y en glucosa al 5% durante 15 días a una temperatura de 4°C, y que a 24°C es estable en cloruro sódico al 0.9% durante 72 horas, y en glucosa al 5% durante 48 horas. Indican que la inestabilidad es debida a la ruptura del anillo betalactámico, lo que produce una coloración amarilla intensa.

Chan, C.Y. y col. [140] describen en 1998 la determinación de cefepima en plasma humano empleando una columna Radial-Pack C<sub>18</sub>, acetonitrilo: ácido 1-heptanosulfónico 0.005 M (8:92), un flujo de 1 ml/min y detección espectrofotométrica a 260 nm. El método de extracción usado consiste en el uso de acetonitrilo como precipitante de proteínas seguido de una centrifugación a 12.000 g durante 1 minuto (97% de recuperación), con una linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 0.78 y 100 µg/ml y un límite de detección de 0.8 µg/ml. Indican que la cefepima es estable en plasma al menos durante 20 días a 4 y -20°C de temperatura.

Notari, R. y col. [141] realizan en 1998 un estudio empleando HPLC, sobre la cinética de degradación y estabilidad de las soluciones acuosas de cefepima, indicando que en el rango de pH entre 4 y 6, estas soluciones son estables a 30°C durante 2 días.

Campanero, M.A. y col. [142] detallan en 1999 la determinación de cefepima en plasma humano empleando una columna Hypersil BDS C<sub>18</sub>, acetonitrilo: tampón acetato a pH 4 (2.8:97.2), un flujo de 1 ml/min y detección espectrofotométrica a 254 nm. El método de extracción usado consiste en el uso de ácido tricloroacético como precipitante de proteínas seguido de una extracción con cloroformo (104% de

recuperación), con una linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 0.5 y 500  $\mu\text{g/ml}$  y un límite de detección de 0.15  $\mu\text{g/ml}$ .

Maddox, F.C. y Stewart, J.T. [143] describen en 1999 la resolución de una mezcla acuosa de cefepima y metronidazol, usando como fase móvil agua y acetonitrilo a pH 3.4 (ajustando con ácido acético e hidróxido potásico) en la proporción 95.5:5.5, con un flujo de 1.5 ml/min y una detección de 280 nm. El método es lineal para un rango de concentraciones entre 19 y 300  $\mu\text{g/ml}$  para cefepima y entre 9 y 150  $\mu\text{g/ml}$  para metronidazol. El límite de detección para cefepima es 125 ng/ml y 63 ng/ml para metronidazol.

Parissi-Poulou, M. y col. [144] detallan en 1999 la determinación de cefepima en muestras de plasma y fluido vítreo humano empleando una columna Hypersil BDS C<sub>18</sub>, fosfato sódico dihidrógeno (pH 3) y metanol en la proporción 87:13 como fase móvil, un flujo de 1 ml/min y detección espectrofotométrica a 270 nm. El método de extracción empleado con el plasma consiste en el uso de ácido perclórico al 70% como precipitante de proteínas seguido de una dilución con agua (96-99% de recuperación). El fluido vítreo fue tratado con 0.35 ml de acetonitrilo y 0.1 ml de ácido perclórico al 70%. La linealidad en plasma comprende el rango de concentraciones entre 1 y 50  $\mu\text{g/ml}$  con un límite de detección de 0.83  $\mu\text{g/ml}$ , y en el fluido vítreo entre 1 y 15  $\mu\text{g/ml}$  con un límite de detección de 0.68  $\mu\text{g/ml}$ .

Breilh, D. y col. [145] describen en 1999 la separación de cefepima y ceftioxima en muestras de suero humano empleando una columna Supelcosil ABZ+, con una fase móvil compuesta por Acetonitrilo y 20 mM de tampón dihidrogenofosfato potásico a pH 2 en la proporción 6:94. El flujo se ajusta a 1 ml/min y la detección espectrofotométrica se realizó a 263 nm. El método de extracción consiste en hacer pasar las muestras por un filtro Microcon (86% de recuperación). La linealidad en suero comprende el rango de concentraciones entre 0.5 y 200  $\mu\text{g/ml}$  con un límite de detección de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  para ambos principios activos.

En 1999 se publicaron dos trabajos de investigación sobre la estabilidad de cefepima en distintas soluciones utilizando HPLC. El primero de ellos, perteneciente a Williamson, J.C. y col. [146] indican que la cefepima es estable en soluciones de

diálisis peritoneal con dextrosa al 1.5% durante 14 días a 4°C, durante 7 días a 25°C y durante 48 horas a 37°C. Por otro lado, Stewart, J. y col. [147] indican que cefepima es estable en bolsas de propileno con cloruro sódico al 0.9% y dextrosa al 5% durante 90 días a -20°C, durante 7 días a 4°C y durante un día a 24°C.

Françoise Bressolle y col. [148] detallan en 2001 la determinación de cefepima en plasma, orina y fluido de diálisis humano empleando una columna Nucleosil C<sub>18</sub> y como fase móvil acetonitrilo y acetato amónico a pH 4 en la proporción 10:90 para plasma y 12:88 para el resto de fluidos, un flujo de 1 ml/min, una temperatura controlada de 35°C y detección espectrofotométrica a 280 nm. El método de extracción usado consiste en el uso de ácido tricloroacético, acetonitrilo y diclorometano para las muestras de plasma (86% de recuperación). Las muestras de orina y las de fluido de diálisis fueron inyectadas directamente en una precolumna para ser lavadas y preconcentradas (87% de recuperación), antes de pasar a la columna cromatográfica, con una linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 0.5 y 100 µg/ml y un límite de detección de 0.2 µg/ml.

Tsai, T.H. y col. [149] realizan en 2001 un estudio farmacocinético de cefepima en bilis de rata empleando una columna Lichrosorb RP-18, ácido fosfórico a pH 3 y metanol en la proporción 87:13 como fase móvil, un flujo de 1 ml/min, una temperatura controlada de 35°C y detección espectrofotométrica a 270 nm. El método de extracción usado consiste en hacer pasar las muestras por una membrana de microdiálisis (69% de recuperación). El método es lineal en el rango comprendido entre 0.05 y 50 µg/ml.

Philippe Moreillon y col. [150] en 2002 evaluaron mediante HPLC la degradación de cefepima en muestras de plasma humano a 20, 37 y 4°C, observando que existe una significativa degradación a las dos primeras temperaturas y que se mantiene estable a 4°C.

Wojciech Musia y col. [151] en 2002 y con ayuda de la cromatografía líquida de alta eficacia, establecen una ecuación de primer orden sobre la estabilidad de muestras de cefepima bajo la influencia de humedad en un rango de 25 al 76.4%.

Lawrence Trissel y col. [152] en 2003 evaluaron mediante HPLC la estabilidad física y química de cefepima en bolsas de acetato de etilenvinil durante 7 días a 23°C y durante 30 días a 4°C, observando que es estable en estas condiciones.

✓ **Electroforesis capilar**

Yahya Mrestani y col. [153] en 1998 determinan las constantes de disociación de varias cefalosporinas, entre ellas cefepima, mediante electroforesis capilar, usando para ello un capilar de 48.5 cm x 50 µm y un detector de diodos monitorizado a 256 nm y a 25 °C. Las muestras eran inyectadas con 50 mbar de presión durante 9 segundos y con un volumen de inyección de 18.8 nl. Los resultados obtenidos son confirmados mediante valoración potenciométrica donde se usó 0.5 M de ácido clorhídrico y 0.5 M de hidróxido sódico, variando el pH desde 1.8 hasta 12.2.

✓ **Espectrofotometría de absorción molecular**

Ródenas, V. y col. [154] en 1995 determinan simultáneamente cefepima y L-arginina sin paso previo de separación, mediante espectrofotometría de segunda derivada.

Con posterioridad a la determinación espectrofotométrica de la constante de disociación de la cefepima desarrollada en esta memoria, Anna Tsantili-Kakoulidou y col. [155] en 2002 publican un trabajo donde determinan varias constantes de disociación de cefepima usando espectrofotometría ultravioleta y valoración potenciométrica.

✓ **Técnicas electroquímicas**

Petr Zuman y col. [156] publican en 2002 un estudio electroquímico de cefepima, donde describen el proceso de reducción y de oxidación con un electrodo de carbono. Manifiestan que el mecanismo de reducción de cefepima es atribuido al enlace N-O que primeramente se protona y posteriormente se reduce, pero no pueden observar este segundo paso ya que se produce a un potencial mas negativo del que permite este

tipo de electrodo. Por otro lado indican que el proceso de oxidación de cefepima es debido al grupo aminotiazol en un solo paso y con la intervención de dos electrones.

Hay que indicar que hemos publicado 2 trabajos en los años 2000 y 2003 [157,158], que forman parte de esta memoria, sobre las características de reducción de la cefepima en un electrodo de mercurio y sobre las propiedades de adsorción sobre el mismo electrodo y sus aplicaciones en la determinación del citado fármaco en fluidos biológicos, respectivamente.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **INSTRUMENTACIÓN REACTIVOS Y DISOLUCIONES MÉTODOS MATEMÁTICOS**

## 2.1 - INSTRUMENTACIÓN

Los distintos instrumentos y aparatos empleados en el desarrollo de la investigación han sido los siguientes:

- ✓ Polarógrafo Metrohm 663 VA con un potenciostato-galvanostato ECO-Chemie PGSTAT 10-Autolab acoplado a un ordenador personal Hyundai 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 3M.
  - Electrodo auxiliar: electrodo de platino.
- ✓ Celda electroquímica Metrohm 6.1415.210.
- ✓ Celda electroquímica termoregurable de doble pared Metrohm EA 876-20.
- ✓ Espectrofotómetro UV-Vis Unicam UV-500 acoplado a un ordenador personal provisto del software Vision 32. Las medidas se realizaron empleando una cubeta de cuarzo de 10 mm de paso de luz.
- ✓ Sistema cromatográfico Merck-Hitachi-Lachrom, consistente en una bomba L-7100 conectada a una columna LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250x4 mm LichroCART con precolumna de 10x4 mm), un detector de diodos L-7544 y un inyector de muestras manual Rheodyne de 20  $\mu\text{l}$  7725i. El equipo está acoplado a un ordenador provisto del software HPLC-System-Manager HSM D-7000, a través del cual se controlan todas las funciones del cromatógrafo así como la adquisición y análisis de datos.
- ✓ pH-metro Crison modelo micropH 2002.
- ✓ Termostato de circulación de agua Tectron 3000543.
- ✓ Agitador mecánico p-Selecta Vibromatic 384.
- ✓ Baño de ultrasonidos p-Selecta Vibromatic.
- ✓ Centrífuga Sigma Laborzentrifugen 4-10.
- ✓ Balanza analítica Mettler AB 104.
- ✓ Equipo de filtración Millipore provisto de matraz kitasato de 1 l, embudo filtrante, placa de vidrio sinterizado y filtros Lida de 47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.



## 2.2 - REACTIVOS Y DISOLUCIONES

A continuación, se enumeran los distintos reactivos y principio activo empleados a lo largo del proceso experimental:

- ✓ Principio activo: clorhidrato de cefepima (Bristol-Myers Squibb), de riqueza superior al 99.5%.
- ✓ Disolventes:
  - Agua desmineralizada (Milli Q plus) de resistividad controlada periódicamente de 18 MΩ/cm.
  - Acetonitrilo (Merck), diclorometano (Merck), metanol (Romil, calidad para cromatografía), etanol (Merck), isopropanol (Merck), dimetilformamida (Merck), peróxido de hidrógeno (Merck), dioxano (Merck), todos ellos de calidad para análisis.
- ✓ Reactivos: ácido ortofosfórico, ácido acético, ácido ascórbico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, monohidrógeno fosfato de sodio y dihidrógeno fosfato de potasio, todos ellos de calidad para análisis y suministrados por Merck.
- ✓ Mercurio (Merck).
- ✓ Disoluciones reguladoras de pH:
  - Tampón fosfato empleado en polarografía diferencial de impulsos y en espectrofotometría de diferentes valores de pH. Se preparan mezclando volúmenes adecuados de una disolución de ácido ortofosfórico 1 M y de una disolución de hidróxido de sodio 1M.
  - Tampón fosfato empleado en voltamperometría de redisolución adsorbtiva catódica de diferentes valores de pH. Se preparan mezclando volúmenes adecuados de una disolución de ácido ortofosfórico 1 M y de una disolución de hidróxido de potasio 1M.
  - Tampón fosfato 0.001 M de pH 7. Se prepara mediante la mezcla de 0.135 g de dihidrógeno fosfato de potasio y 0.14 g de monohidrógeno fosfato de sodio y enrasando con agua hasta 100 ml.

- ✓ Sales: las disoluciones de los iones se prepararon a partir de las sales que se detallan en la siguiente tabla. Todas las sales empleadas fueron de pureza analítica y suministradas por Merck (Tabla 2.1.).

Tabla 2.1. Sales empleadas en el proceso experimental.

<b>Ión</b>	<b>Sal del ión</b>
Al <sup>3+</sup>	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Ca <sup>2+</sup>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O
Fe <sup>3+</sup>	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9 H <sub>2</sub> O
Fe <sup>2+</sup>	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O
Mg <sup>2+</sup>	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O
Zn <sup>2+</sup>	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O
Ni <sup>2+</sup>	Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O
Mn <sup>2+</sup>	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O
Co <sup>2+</sup>	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O
Cu <sup>2+</sup>	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 3 H <sub>2</sub> O

## 2.3 - TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

En este apartado se resumen las diferentes metodologías empleadas para el tratamiento de los datos analíticos. Esta descripción se divide en dos secciones: por una parte el estudio de la etapa de calibración; y por otra, los procedimientos de validación aplicados a los diferentes métodos analíticos que se proponen.

### 2.3.1 - CALIBRACIÓN

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos. Por tanto, el primer paso en el desarrollo de un método de análisis relativo para obtener la concentración de analito presente en una muestra es la comparación de la señal analítica con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que se denomina proceso de calibración química. Es por ello por lo que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo

se podrá obtener una buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración.

La calibración univariante, usando un modelo de línea recta, es una de las operaciones más frecuentes en química analítica. La relación entre la señal analítica medida y la concentración del analito se considera del tipo  $Y = a + bX$ , donde  $Y$  representa la señal analítica y  $X$  la concentración del analito presente. La relación entre  $Y$  y  $X$  podría incluir otros términos, como en el caso de la ecuación  $Y = a + b_1X + b_{11}X^2$ . De este modo no nos tendríamos que restringir únicamente al intervalo recto sino que podríamos extendernos hacia concentraciones más elevadas. Sin embargo, existen diversas razones que justifican la utilización preferente de ecuaciones del tipo línea recta.

En primer lugar, existe a menudo un soporte teórico en forma de ley, (ecuación de Lambert-Beer, ecuación de Ilkovich, etc.) que justifica la relación lineal entre la respuesta instrumental y la concentración de analito presente. No se dispondrá de este soporte teórico si se emplea la parte curva del modelo matemático.

En segundo lugar, cualquier modelo que incluya términos de segundo grado o más elevados, introduce curvatura en la representación gráfica  $Y = f(X)$ , con lo que a medida que se aumenta la concentración de analito, normalmente se pierde sensibilidad en el análisis y como consecuencia se incrementa notablemente la imprecisión asociada al valor buscado de la concentración del analito.

El proceso de calibración consta de dos etapas:

- ✓ ***Etapas de calibración.*** En ella se establece el modelo que relaciona la variable dependiente, señal analítica, con la variable independiente, o concentración.
- ✓ ***Etapas de predicción.*** Consiste en obtener los valores de las variables independientes, es decir las concentraciones, de una o más muestras problema a partir del valor obtenido para la variable dependiente. El valor de la variable independiente correspondiente a muestras patrón junto con las sensibilidades, permiten predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

El procedimiento más habitual para obtener la expresión matemática de la recta a partir de los datos obtenidos al realizar el calibrado, es el método de los mínimos cuadrados. En estos casos, se asume que:

- La relación entre la variable independiente y la variable dependiente, concentración y señal analítica, respectivamente, será lineal en todo el rango de aplicabilidad.
- Los errores se tienen que producir únicamente en la medida de la señal instrumental. Esto significa que la variable concentración no debe estar afectada por errores aleatorios, o que su error sea despreciable frente a la respuesta. En la práctica este error se minimiza con el empleo de sustancias patrón.

La recta generada por el método de los mínimos cuadrados [159] es aquella que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales (desviación vertical de cada punto respecto a la recta) de todos los puntos. Tendiendo en cuenta este criterio, las ecuaciones a partir de las cuales se calculan la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a) serían:

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

La desviación estándar en la pendiente ( $s_b$ ) y en la ordenada en el origen ( $s_a$ ) se calculan partiendo del cálculo de  $s_{y/x}$  (desviación de la recta):

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \tilde{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \tilde{x}_i)^2 \right\}^{1/2}}$$

$$s_a = s_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \tilde{x}_i)^2} \right\}^{1/2}$$

donde  $\tilde{x}_i$  e  $\tilde{y}_i$  representan la media de los valores de concentración del analito y de la señal analítica, respectivamente.

### 2.3.2 – VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Para hablar de validación, es necesario conocer su significado. Existen varias definiciones de validación de un método analítico; a continuación se mencionarán algunas que son las que explican más claramente el contexto de la validación:

- Procedimiento mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio, que el método cumple con el propósito para el cual fue creado.
- Proceso que establece por medio de estudios de laboratorio que las características de funcionamiento y de comportamiento de un procedimiento cumplen los requisitos, siendo adecuadas para la aplicación analítica.

- Procedimiento mediante el cual se prueba la exactitud y confianza de un método analítico y se demuestra que se puede aplicar en un laboratorio.

En conclusión la validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas de dicho método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación. Estas características representativas se expresan en términos de parámetros analíticos, que son los siguientes:

- ✓ **Exactitud:** es la aproximación de los resultados experimentales obtenidos, al valor verdadero.
- ✓ **Precisión:** es el grado de concordancia entre los resultados individuales de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetitivamente a muestras múltiples o a una muestra homogénea. Para evaluar la precisión de un sistema se analiza una concentración conocida de la sustancia de interés y se establece un número de réplicas. La precisión del método, se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa y puede ser una medida, ya sea del grado de reproducibilidad o repetitividad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Hay que diferenciar entre reproducibilidad y repetitividad; mientras que la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, o con distintos operadores o con distintos equipamientos, la repetitividad se refiere al uso del procedimiento analítico dentro del laboratorio por un período corto de tiempo, por el mismo analista y utilizando el mismo equipo. En referencia a este último parámetro, a lo largo de la presente memoria, se distinguirá entre repetitividad intradía (en el mismo día) y repetitividad interdía (en varios días). Estos parámetros estadísticos fueron calculados de acuerdo a las siguientes expresiones [159]:

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

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

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

- ✓ **Selectividad:** es la capacidad del método para determinar con exactitud y precisión el analito en presencia de componentes que se espera estén presentes en la matriz de la muestra. Se determina como el grado de diferencia que se obtiene al comparar los resultados analíticos de muestras contaminadas con impurezas, con los resultados de la muestra sin contaminar. La interferencia se determina como la diferencia obtenida entre los resultados de los grupos de muestras. La selectividad es una medida de grado de interferencia (o ausencia de la misma) en el análisis de muestras complejas.
  
- ✓ **Límite de detección y cuantificación:** es el límite de detección (LD) es definido por la IUPAC [160] como la concentración derivada de la medida más pequeña de señal que puede ser detectada con una certeza razonable, para un procedimiento analítico dado. El límite de cuantificación (LC), por su parte, se define como la mínima concentración que puede ser cuantificada de manera fiable. Para métodos instrumentales, la IUPAC recomienda tomar como límite de detección tres veces el valor de la desviación estándar del blanco (que, teniendo en cuenta los parámetros de regresión obtenidos con el método de los mínimos cuadrados, puede identificarse como  $s_{y/x}$ ) dividida por la pendiente de la recta de calibrado. El límite de cuantificación se obtendría de manera similar, multiplicando la desviación estándar del blanco por diez en lugar de tres. En el caso de técnicas cromatográficas, la IUPAC [144] recomienda que estos dos parámetros analíticos se determinen teniendo en cuenta la desviación estándar de la ordenada en el origen, según las siguientes ecuaciones:

$$y-b = 3.3 S_a$$

$$y-b = a LD$$

$$y-b = 10 S_a$$

$$y-b = a LC$$

- ✓ **Linealidad:** es la capacidad del método para obtener resultados que son directamente o por una transformación matemática bien definida, proporcionales

a la concentración del analito en las muestras dentro de un rango dado. Se suele relacionar con el coeficiente de correlación ( $r$ ).

- ✓ **Robustez:** es el grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba, obtenidos por el análisis de una misma muestra, bajo una variación de las condiciones normales de prueba, tales como diferentes laboratorios, analistas, ensayos, temperaturas, lotes de reactivos, días, etc. Es una medida de la reproducibilidad de los datos de la prueba, bajo las condiciones operacionales normalmente esperadas de laboratorio a laboratorio y de analista a analista.
- ✓ **Rango de aplicación:** es el intervalo comprendido entre el nivel más alto y más bajo del analito en el que se ha demostrado que el método tal y como se indica, puede ser aplicado con exactitud, precisión y linealidad.

### 2.3.3.- EVALUACIÓN DE LA VERACIDAD

La evaluación de la veracidad de un resultado consiste en estimar la concentración del analito en una muestra y compararla con el valor verdadero empleando el protocolo estadístico apropiado [161]. Ya que es imposible conocer el valor verdadero de una especie química en una muestra, es necesario obtener un valor verdadero convencional o aceptado para emplearlo como valor de referencia; este último puede ser obtenido mediante dos estrategias: empleando un estudio interlaboratorio o un estudio intralaboratorio.

Dentro de un laboratorio están disponibles dos alternativas para demostrar la veracidad de un método analítico: el uso de materiales de referencia y la comparación con métodos de referencia.

Antes de realizar las experiencias necesarias para demostrar la veracidad del método de análisis desarrollado es necesario evaluar si los constituyentes de las muestras sobre las que se aplicará el nuevo método de análisis generan errores sistemáticos constantes o proporcionales sobre la respuesta analítica. Estos efectos pueden demostrarse cuando se comparan rectas de calibrado realizadas en ausencia y presencia de la matriz.



Las interferencias causan un error sistemático constante manifestándose con iguales valores de las pendientes de las rectas de calibrado en ausencia o presencia de la muestra y señales más altas (error por exceso) o más bajas (error por defecto) que las esperadas..

El efecto matriz causa un error sistemático proporcional manifestándose con un cambio de las pendientes de las rectas de calibrado en ausencia o presencia de la muestra. Las dos soluciones posibles para reducir el efecto matriz son: i) preparar la serie de disoluciones patrón imitando la composición de la muestra, lo que se conoce como calibración externa y ii) preparar la recta de calibrado de forma que todos los patrones contengan muestra y la contengan en la misma cantidad. Este procedimiento se denomina método de adición de patrón y se aplica cuando la matriz es compleja y no puede ser imitada artificialmente. Todas ellas contienen la misma cantidad de muestra y cantidades crecientes de patrón.

#### ✓ *Test de comparación de dos rectas de regresión*

En muchas situaciones es necesario demostrar estadísticamente que existen diferencias entre los calibrados en ausencia o presencia de la muestra. El protocolo estadístico que se aplica en este caso es el test o prueba de comparación de dos rectas de regresión.

Esta metodología implica la realización de dos experiencias de calibrado: un calibrado con patrones y un calibrado de adición de patrón. A continuación se comparan ambas funciones de calibrado para conocer la existencia o no de diferencias significativas.

Para llevar a cabo la comparación, se realiza inicialmente un test de comparación de las varianzas de los valores residuales de ambas rectas. El procedimiento a seguir es el siguiente:

i) *Comparación de las varianzas de ambos calibrados*

Se comparan mediante el test de la  $F$  de Snedecor. Las hipótesis consideradas en este test son:

<i>Varianzas iguales</i>	$s_1^2 = s_2^2$	$F_{cal} < F_{tab}$	hipótesis nula ( $H_0$ )
<i>Varianzas distintas</i>	$s_1^2 \neq s_2^2$	$F_{cal} \geq F_{tab}$	hipótesis alternativa ( $H_1$ )

Este test compara un valor del estadístico  $F$  *calculado* según la siguiente ecuación con un valor tabulado para  $n_1-2$  y  $n_2-2$  grados de libertad, con un nivel de significación del 5%, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de puntos experimentales de cada una de las funciones de calibrado.

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}; (s_1 > s_2)$$

donde  $s_1^2$  y  $s_2^2$  representan las varianzas de los valores residuales para ambas rectas de calibrado.

ii) *Comparación de pendientes.*

Se realiza mediante el test de la  $t$  de Student. Las hipótesis a tener en cuenta son las siguientes:

<i>Pendientes iguales</i>	$b_1 = b_2$	$t_{cal} < t_{tab}$	hipótesis nula ( $H_0$ )
<i>Pendientes distintas</i>	$b_1 \neq b_2$	$t_{cal} \geq t_{tab}$	hipótesis alternativa ( $H_1$ )

El estadístico  $t_{cal}$  es diferente en función de la existencia o no de una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos:

- Si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los valores residuales  $t$  será calculado según la ecuación 9.

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{b_1}^2}{\Sigma(c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{s_{b_2}^2}{\Sigma(c_2 - \bar{c}_2)^2}}}$$

donde  $S_{b_1}$  y  $S_{b_2}$  representan los valores de la desviación estándar de la pendiente para el calibrado con patrones y el calibrado de adición patrón, respectivamente.

El valor de  $t$  calculado se compara con el valor de  $t$  tabulado para un nivel de significación del 5% y  $f$  grados de libertad, calculados según la expresión:

$$f = \frac{\frac{s_{b_1}^2}{\Sigma(c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{s_{b_2}^2}{\Sigma(c_2 - \bar{c}_2)^2}}{\frac{s_{b_1}^2 / \Sigma(c_1 - \bar{c}_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{s_{b_2}^2 / \Sigma(c_2 - \bar{c}_2)^2}{n_2 - 2}}$$

- Si no existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_{b_{1,2}} \sqrt{\frac{1}{\Sigma(c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{1}{\Sigma(c_2 - \bar{c}_2)^2}}}$$

donde

$$S_{b_{1,2}}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{b_1}^2 + (n_2 - 2)s_{b_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

el valor de *t calculado* se compara con el valor de *t tabulado* con  $n_1+n_2-4$  grados de libertad y con un nivel de significación del 5% , siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de patrones empleados en la preparación de las rectas de calibrado comparadas.

✓ ***Empleo de métodos de referencia***

Otra alternativa para la validación de la veracidad de un método analítico es el uso de un método de referencia del cual se conoce que puede aplicarse al mismo tipo de muestra y además está suficientemente evaluado, por ejemplo un método que ha sido previamente validado. Los dos métodos de análisis son aplicados a diferentes alicuotas provenientes de una misma disolución de la muestra. El contenido de analito debe ser apropiado para los requerimientos de cada método. El procedimiento estadístico usado para determinar la veracidad es la comparación de dos medidas independientes (test de significación t de Student).

Para iniciar el protocolo estadístico se evalúa si las desviaciones estándar de los dos métodos difieren o no significativamente. Se emplea la prueba de la F de Snedecor. Este test compara un valor del estadístico F calculado según la siguiente ecuación con un valor tabulado para  $n_1-1$  y  $n_2-1$  grados de libertad, con un nivel de significación del 5%, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de medidas experimentales de cada uno de los métodos.

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}; (s_1 > s_2)$$

- Si no existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s\sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

donde  $t$  tiene  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad y  $s$  es la desviación estándar ponderada calculada según la ecuación siguiente:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

- Si existe diferencia significativa entre la varianzas se usa la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

En este caso el número de grados de libertad  $f$  se calcula con la ecuación:

$$f = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 + 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 + 1}} - 2$$

## **CAPÍTULO 3**

---

### **ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO POLAROGRÁFICO Y DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA POR POLAROGRAFÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS**

En este capítulo se realiza un estudio del comportamiento polarográfico de la cefepima: influencia del pH, amplitud de impulso, influencia de la temperatura sobre la reducción de la cefepima, la naturaleza del proceso por voltamperometría cíclica, estudio que permite establecer si dicho proceso es reversible o no en las condiciones estudiadas. Además, se calcula el número de protones y electrones que intervienen en el proceso de reducción y se propone un mecanismo de reducción. Estos estudios permiten establecer las condiciones óptimas para la determinación de la cefepima en fluidos biológicos y en especialidades farmacéuticas.

### 3.1.- ESTUDIOS PREVIOS

En una serie de ensayos sobre el comportamiento polarográfico de la cefepima, y tras registrar los polarogramas obtenidos por polarografía diferencial de impulsos y por polarografía *tast*, se pudo observar que presenta dos ondas catódicas a potenciales de semionda de aproximadamente  $-0.48$  V (onda I) y  $-0.85$  V (onda II) como puede verse en la Figura 3.1, correspondiente a una muestra que contenía  $480$   $\mu\text{g}$  de la cefepima,  $5$  ml de tampón fosfato de pH  $2.7$  y agua Milli-Q hasta completar un volumen de  $25$  ml. Una vez preparada la muestra, se trasvasó a la celda electroquímica 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 polarogramas. El barrido se realizó desde  $0$  hasta  $-1.2$  V, utilizándose una velocidad de barrido de  $5$   $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de  $-100$  mV, en el caso de polarografía diferencial de impulsos.

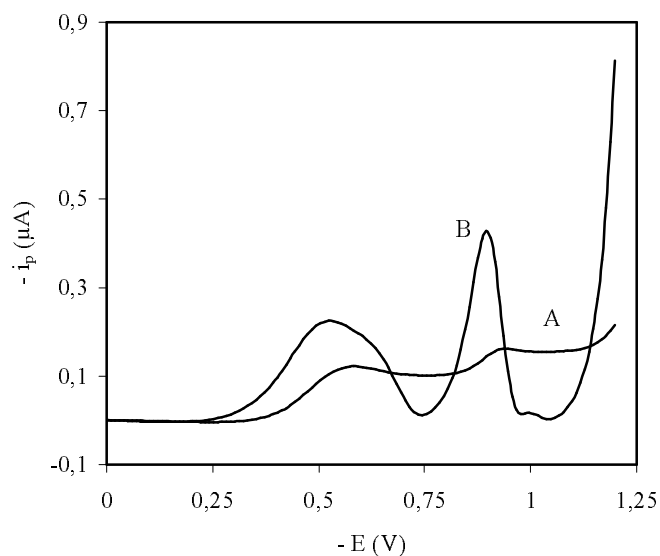


Figura 3.1. Reducción polarográfica de la cefepima a pH 2.7. Polarografía tast (A) y polarografía diferencial de impulsos (B).

Tras realizar diversos estudios sobre el comportamiento polarográfico de la cefepima variando el pH, se observó que la primera onda es muy ancha, y su forma y posición dependen del pH. Así, y a valores de pH elevados (4-9), la onda se divide en dos; a valores muy básicos (mayor de 9) aparece dos picos no resueltos, y a valores muy ácidos (menor de 2) las dos ondas aparecen solapadas y se comportan como un solo pico con un hombro. Únicamente, en el rango de pH de 2 a 4, la primera onda aparecía separada, pero con una forma no simétrica. Debido a esto, se decidió no estudiar a fondo la primera onda debido a su escaso interés analítico, y considerar como principal onda de estudio a la segunda onda catódica, que está mejor definida e implica la reducción del doble enlace C(3)=C(4) en el esqueleto del anillo de la cefalosporina (Figura 3.2).

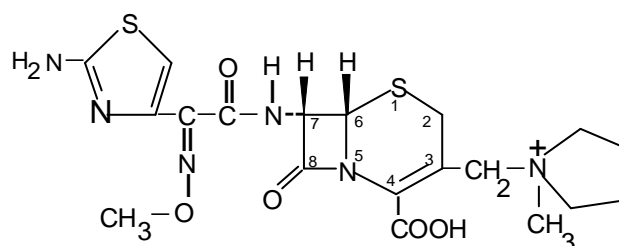


Figura 3.2. Estructura química de la cefepima.



### 3.2.- INFLUENCIA DEL pH

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones acuosas de distintos valores de pH entre 1.6 y 12.1, añadiendo volúmenes variables de ácido ortofosfórico 1 M e hidróxido sódico 1 M hasta un volumen total de 5 ml. La concentración de la cefepima en 25 ml de las disoluciones fue de  $4 \cdot 10^{-5}$  M. Posteriormente se registraron los correspondientes polarogramas por polarografía diferencial de impulsos entre 0 y -1.2 V, utilizando una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  y una amplitud de impulso de -100 mV.

En la Tabla 3.1 se recogen los valores de potencial e intensidad de pico obtenidos a distintos valores de pH para la onda de reducción de la cefepima.

*Tabla 3.1.* Efecto del pH sobre  $E_p$  e  $i_p$  en polarografía diferencial de impulso de una disolución de la cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M.

pH	$E_p$ (V)	$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )
1.6	-0.85	-0.334
1.7	-0.86	-0.367
2.0	-0.87	-0.385
2.4	-0.89	-0.421
2.7	-0.91	-0.425
3.0	-0.93	-0.433
3.4	-0.95	-0.437
3.7	-0.98	-0.442
4.1	-0.99	-0.449
4.5	-1.02	-0.452
4.8	-1.05	-0.449
5.0	-1.07	-0.44
6.1	-1.15	-0.415
7.1	-1.18	-0.395
7.7	-1.23	-0.377
8.5	-1.29	-0.327
9.8	-1.33	-0.285
12.1	-1.53	-0.255

En la Figura 3.3 se encuentra la representación de la intensidad de pico frente al pH. La altura del pico alcanza un valor máximo entre 2.5 y 5.5, decreciendo a pH superiores. A la vista de estos resultados, el valor de pH escogido es 2.7 para estudios posteriores, que se fija añadiendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7.

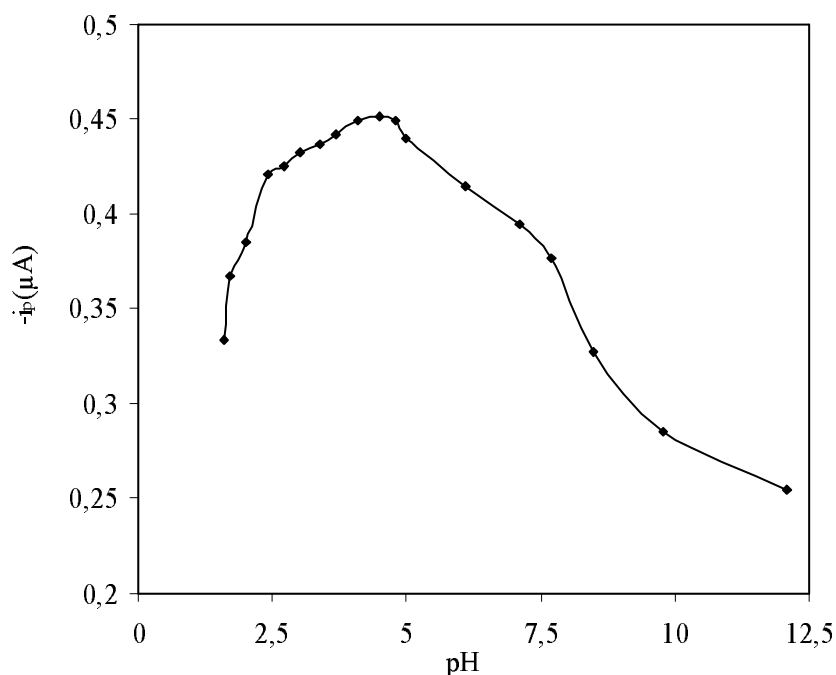
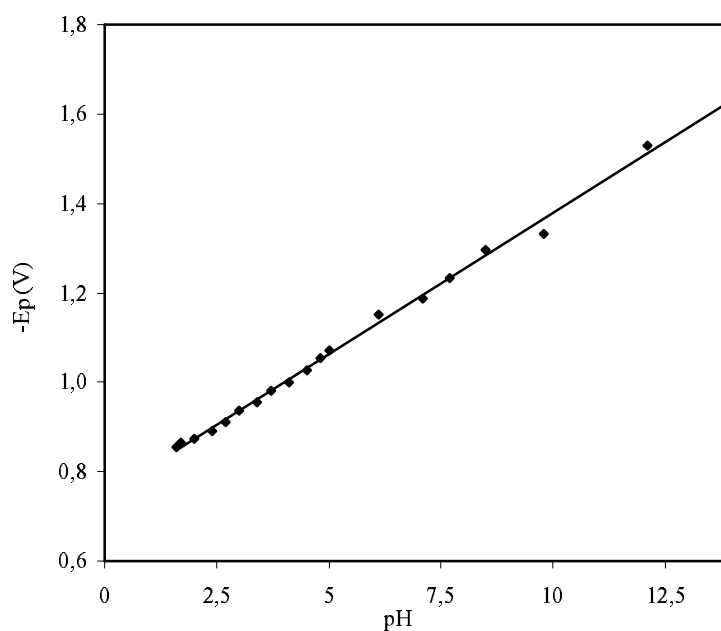


Figura 3.3. Variación de la intensidad de pico con el pH para la onda de reducción de la cefepima.

La representación de potencial de pico frente al pH aparece en la Figura 3.4. En ella puede observarse como a medida que el pH aumenta, el potencial de pico crece hacia valores más negativos. Esta dependencia del pH con el potencial de pico muestra claramente que los protones participan directamente en el proceso de reducción. Se observa una dependencia lineal entre el potencial de pico y el pH en el intervalo de pH 1.6-12.1. Esta dependencia lineal sigue la siguiente ecuación:

$$E_p (\text{V}) = - 0.063 \text{ pH} - 0.747; r = 0.998$$



*Figura 3.4.* Variación de la potencial de pico con el pH para la onda de estudio de la cefepima.

Se ha estudiado la influencia de la concentración de tampón fosfato/hidróxido sódico añadiendo concentraciones superiores a 1M en muestras de iguales características a las preparadas en este apartado. Este estudio mostró que la concentración 1M era suficiente para fijar el valor de pH y para garantizar la migración en la disolución.

### 3.3.- INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DE IMPULSO APLICADO

Se hace necesaria la elección de un valor determinado en la magnitud de impulso aplicado, elección que debe ser un compromiso entre dos factores como son la sensibilidad y la resolución. 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 se hace imprescindible tomar un valor de amplitud de impulso con el que se alcance una buena sensibilidad sin perder resolución.

Para ello, se prepararon disoluciones de cefepima de  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y se

registraron los polarogramas correspondientes entre 0 y -1.2 V, fijando la velocidad de barrido a  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y variando la amplitud de impulso entre -10 y -180 mV.

En la Tabla 3.2 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, aumenta la intensidad de pico y el valor del potencial de la onda de estudio se va desplazando hacia valores menos catódicos.

En la Figura 3.5 se han representado los valores de las intensidades de pico frente a los valores aplicados de amplitud de impulso.

Tabla 3.2. Variación de las intensidades y potenciales de pico con la variación de la amplitud de impulso aplicado.

$\Delta E$ (mV)	$i_p$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_p$ (V)
-10	-0.014	-0.94
-20	-0.035	-0.94
-30	-0.061	-0.94
-40	-0.094	-0.94
-50	-0.133	-0.93
-60	-0.180	-0.93
-70	-0.230	-0.92
-80	-0.288	-0.92
-90	-0.349	-0.91
-100	-0.423	-0.91
-120	-0.534	-0.90
-140	-0.653	-0.88
-160	-0.743	-0.87
-180	-0.802	-0.85

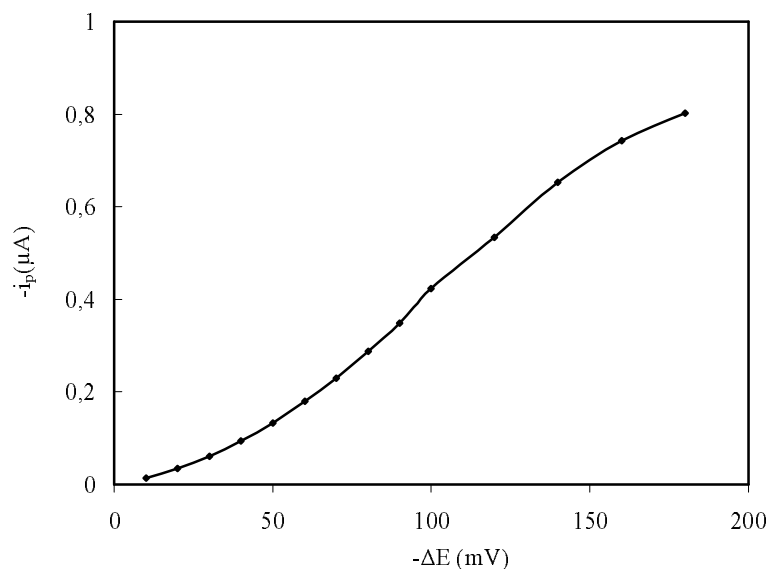


Figura 3.5. Variación de la intensidad de pico de reducción de la cefepima en función de la amplitud de impulso aplicado.

Se elige -100 mV como valor óptimo de amplitud de impulso.

### 3.4.- INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO

Para el estudio de la influencia de la velocidad de barrido se prepararon disoluciones de cefepima de concentración  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Se registraron los polarogramas correspondientes entre 0 y -1.2 V, fijando la amplitud de impulso a -100 mV y variando la velocidad de barrido entre 2 y 20  $mV \cdot s^{-1}$ .

En la Tabla 3.3 figuran los valores de las intensidades de pico frente a los valores aplicados de la velocidad de barrido.

Tabla 3.3. Variación de las intensidades de pico con la variación de la velocidad de barrido aplicado.

$V_b$ (mV/s)	$i_p$ ( $\mu$ A)	$E_p$ (V)
2	-0.431	-0.91
5	-0.429	-0.91
10	-0.425	-0.90
20	-0.427	-0.90

Se observa que a medida que aumenta la velocidad de barrido, la intensidad y el potencial de pico se mantienen prácticamente constantes en el intervalo estudiado. Se elige 5 mV/s como valor óptimo para la velocidad de barrido.

### 3.5.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la intensidad de corriente es importante para determinar el tipo de corriente que controla el proceso de reducción polarográfico. En general, las corriente de tipo difusivo presenta 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. Esto es debido a que los coeficientes de adsorción son inversamente proporcionales a la temperatura.

El coeficiente de temperatura viene dado por la ecuación:

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

donde  $i_2$  es la intensidad de corriente a la temperatura  $T_2$  e  $i_1$  es la intensidad de corriente a la temperatura  $T_1$ . Siempre  $T_2$  debe ser mayor que  $T_1$ .

Para realizar este estudio se prepararon disoluciones de cefepima de concentración  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras así preparadas se llevaron a la celda electroquímica termostatzada donde se pasó nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los correspondientes polarogramas mediante las técnicas *tast* y polarografía diferencial de impulsos, variando la temperatura en el intervalo comprendido entre  $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$  y  $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

En la Tabla 3.4 se recogen los valores de los logaritmos de las intensidades límite y de pico respectivamente para cada valor de temperatura y en las Figuras 3.6 y 3.7 se encuentran representados estos datos.

Tabla 3.4. Variación del logaritmo de la intensidad límite y de pico con la temperatura.

Temperatura (°C)	$\log i_l (\mu\text{A})$	$\log i_p (\mu\text{A})$
25	-0.769	-0.375
30	-0.723	-0.338
35	-0.677	-0.294
40	-0.657	-0.265
45	-0.602	-0.198
50	-0.552	-0.154
55	-0.508	-0.110
60	-0.468	-0.117

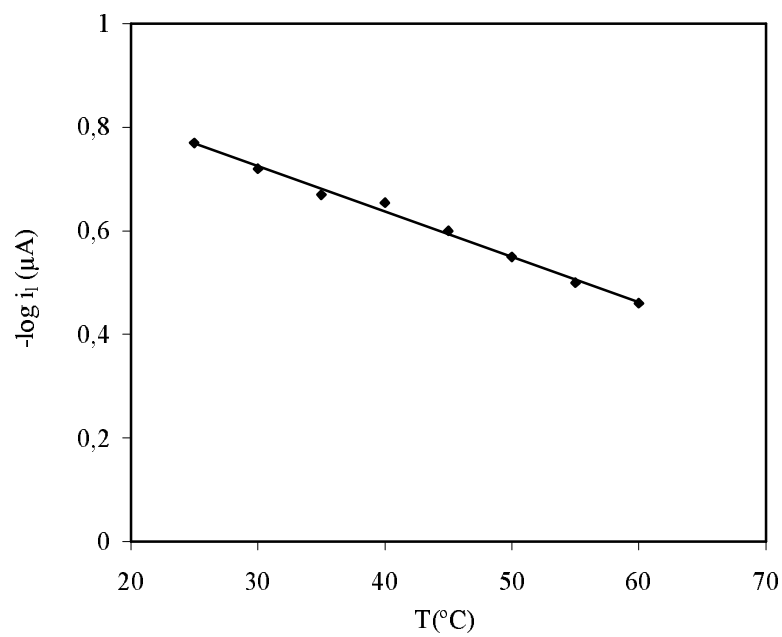


Figura 3.6. Variación del logaritmo de la intensidad límite con la temperatura.

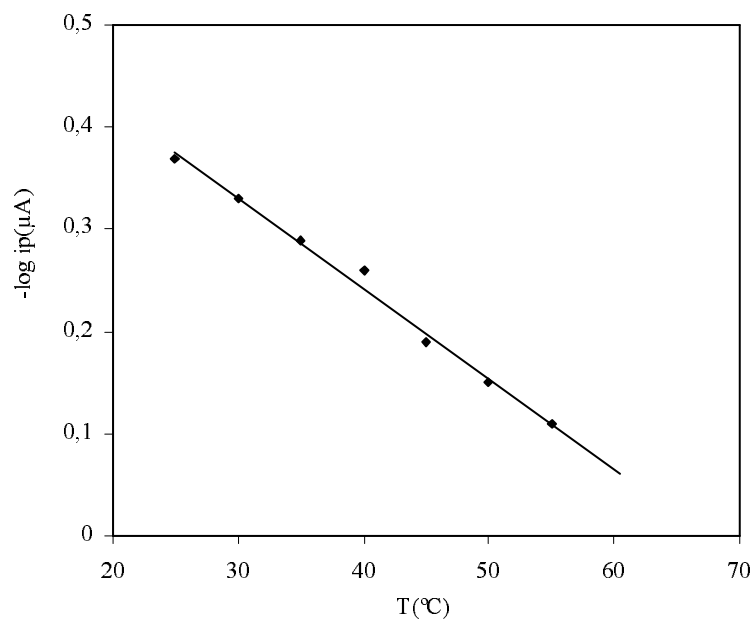


Figura 3.7. Variación del logaritmo de la intensidad de pico con la temperatura.



Los coeficientes de temperatura se recogen en la Tabla 3.5.

*Tabla 3.5. Coeficientes de temperatura de la cefepima para tast y polarografía diferencial de impulsos.*

	<b>TAST</b>	<b>DPP</b>
Coeficiente temperatura %	1.95 ± 0.13	1.87 ± 0.15

Para la onda estudiada, tanto por tast como por polarografía diferencial de impulsos, los valores de los coeficientes de temperatura concuerdan con un proceso controlado por difusión.

### **3.6.- ESTUDIOS DE LA NATURALEZA DEL PROCESO ELECTRÓDICO**

#### **3.6.1.- ESTUDIOS DE LA REVERSIBILIDAD**

Al objeto de conocer si el proceso de reducción de la cefepima transcurre de forma reversible o irreversible, se emplearon varios criterios: análisis logarítmico de la función intensidad-potencial, criterio  $E_{3/4} - E_{1/4}$  de Meites, voltamperometría cíclica y criterio de Birke.

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 electrones, i es la corriente producida para cada potencial aplicado (en A), e  $i_l$  es la corriente límite de difusión (en A). En consecuencia, la representación de -E

frente al  $\log (i/i_1-i)$ , para un proceso reversible controlado por difusión, a 25 °C, debería dar como resultado una recta con una pendiente igual a  $0.059/n$  [162].

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

$$E = E_{1/2} - \left( \frac{0.059}{n\alpha} \right) \log \left( \frac{i}{i_1 - i} \right)$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de transferencia electrónica.

La representación de  $-E$  frente al  $\log (i/i_1-i)$  dará como resultado una recta con una pendiente igual a  $0.059/n\alpha$  y una ordenada en el origen igual a  $E_{1/2}$ . A partir de estos valores obtenidos en el diagrama logarítmico correspondiente, se puede determinar el parámetro cinético  $n\alpha$ .

De esta forma, se prepararon disoluciones de cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras así preparadas se trasvasaron a una celda electroquímica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos registrándose los polarogramas mediante polarografía *tast*.

En la Tabla 3.6 se recoge los valores de  $\log [i/(i_1-i)]$  frente a los de potencial, donde la intensidad de difusión ( $i_1$ ) posee un valor de  $6 \cdot 10^{-8}$  A. La representación de estos datos se encuentra en la Figura 3.8.

Tabla 3.6. Variación del log  $[i/(i_1-i)]$  con el potencial respectivo.

E(V)	log $[i/(i_1-i)]$
-0.81	-0,61
-0.82	-0,296
-0.83	-0,125
-0.84	0,011
-0.85	0,247
-0.86	0,498
-0.87	0,679
-0.88	0,981

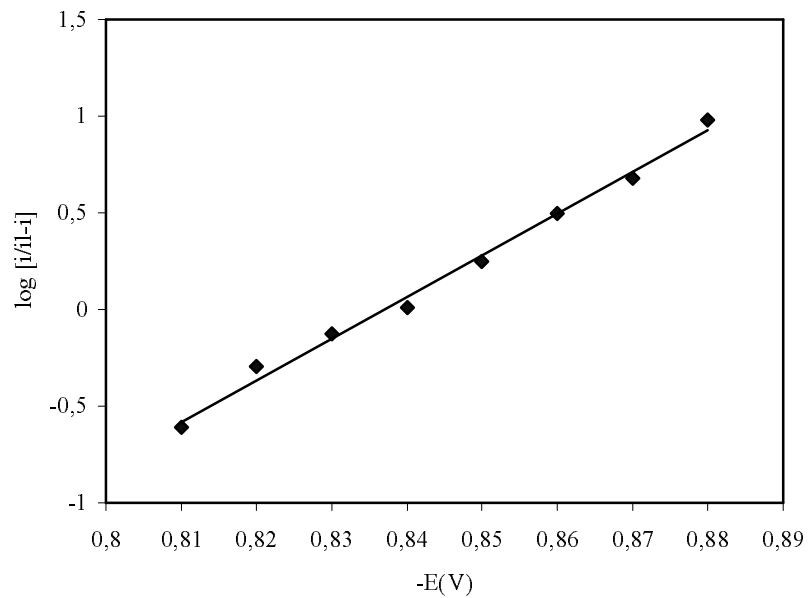


Figura 3.8. Variación del potencial en función del log  $[i/(i_1-i)]$ .

La ecuación que rige esta relación es:

$$\log i/i_1-i = 21.9 E - 18.45$$

La ordenada en el origen nos proporciona un valor para el potencial de semionda de -0.84, y a través de la pendiente, 21.9, se obtiene un valor de  $n\alpha$  de 1.3. En el caso

que  $n$  sea igual a 2 se obtiene un valor de  $\alpha$  de 0.65, lo que muestra claramente que el proceso que tiene lugar es un proceso irreversible.

En criterio  $E_{3/4} - E_{1/4}$  de Meites se basa en la medida de los valores de  $E_{3/4}$  y  $E_{1/4}$  en los polarogramas registrados por polarografía *tast*, siendo estos los potenciales para los cuales la corriente es igual a  $3/4$  y  $1/4$ , respectivamente, de la corriente límite de difusión. Para un proceso electroquímico reversible debe cumplir la expresión:

$$E_{3/4} - E_{1/4} = -\frac{0.059}{n}$$

Un proceso irreversible tendrá que cumplir que:

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

Para ello se registraron los polarogramas por polarografía *tast* de dos disoluciones de cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y 5 y completando con agua Milli-Q hasta un volumen de 25 ml, obteniéndose unos valores de  $E_{3/4} - E_{1/4}$  de 50 y 55 mV, respectivamente. Mediante este criterio se corrobora la irreversibilidad del proceso de reducción de la cefepima.

Igualmente se puede confirmar la irreversibilidad del proceso redox mediante voltamperometría cíclica. Esta técnica aporta diversos criterios para evaluar la reversibilidad de los procesos electroquímicos:

- ✓ Variación de  $E_p$  con  $V_b$ .
  - Proceso reversible:  $E_p$  no depende de  $V_b$ .
  - Proceso cuasirreversible:  $E_p$  se desplaza catódicamente al aumentar  $V_b$ .
  - Proceso irreversible:  $E_p$  se desplaza catódicamente  $30/n\alpha$  mV cuando  $V_b$  aumenta en un factor de 10.

- ✓ Cociente entre las intensidades de pico anódico y catódico ( $i_p^a/i_p^c$ ).
  - Proceso reversible:  $i_p^a/i_p^c = 1$  e independiente de  $V_b$ .
  - Proceso cuasirreversible:  $i_p^a/i_p^c =$  sólo si  $\alpha = 0.5$ .
  - Proceso irreversible: no aparece señal en el barrido inverso.
  
- ✓ Diferencia entre los potenciales de pico anódico ( $E_p^a$ ) y catódico ( $E_p^c$ ).
  - Proceso reversible  $E_p^a - E_p^c = 0.059/n$  a 25 °C.
  - Proceso cuasirreversible:  $E_p^a - E_p^c$  se aproxima a 60 mV para valores pequeños de  $V_b$  y aumenta al hacerlo  $V_b$ .
  - Proceso irreversible: no aparece señal en el barrido inverso.

Tal y como se muestra en la Figura 3.9 se obtiene únicamente señal de reducción, sin aparecer en el barrido anódico la señal de oxidación correspondiente, indicando que el proceso es irreversible.

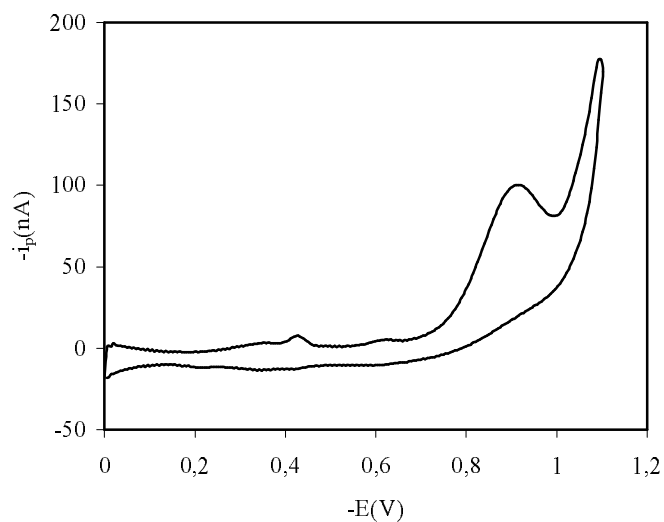


Figura 3.9. Estudio de reversibilidad mediante voltamperometría cíclica.

Otro criterio para establecer la irreversibilidad del proceso rédox es el de Birke, basado en las diferencias entre potenciales del pico catódico y del anódico, así como entre las intensidades de pico anódica y catódica.

Para aplicar este criterio se obtuvieron polarogramas de una misma muestra, con amplitudes de pulso negativa y positiva de igual valor.

En resumen, las posibilidades que pueden observarse al aplicar este criterio, así como las conclusiones que pueden deducirse en cada caso son [163]:

✓ Proceso reversible.

- $E_p^c - E_p^a = |\Delta E|$
- $i_p^a / i_p^c = 1$

✓ Proceso cuasirreversible.

- $E_p^c - E_p^a \approx |\Delta E|$
- $i_p^a / i_p^c < 1$  para  $\alpha \geq 0.5$
- $i_p^a / i_p^c > 1$  para  $\alpha < 0.5$

✓ Proceso irreversible.

- $E_p^c - E_p^a \approx |\Delta E|$
- $i_p^a / i_p^c < 1$

En el caso de la cefepima  $i_p^a$  es prácticamente despreciable, como puede observarse en la Figura 3.10, indicando que el proceso es irreversible.

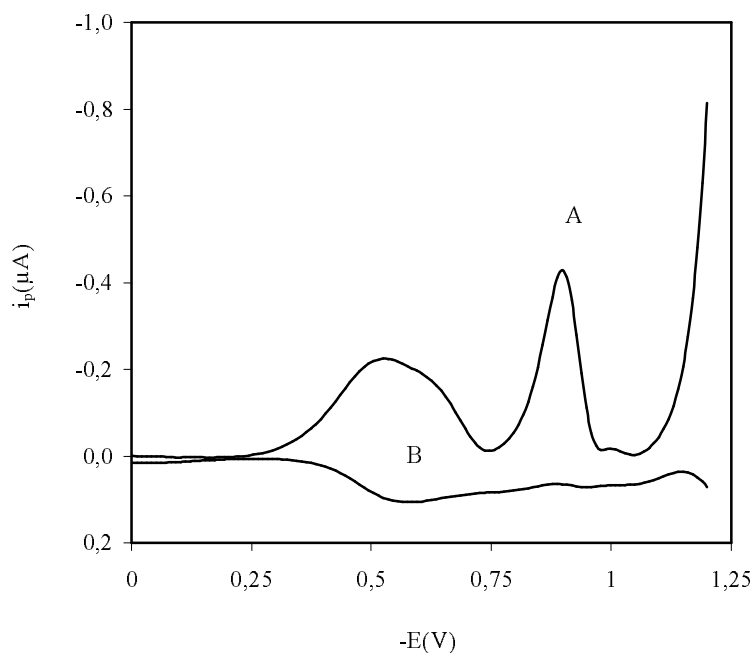


Figura 3.10. Barrido catódico (A) y anódico (B) de la cefepima.

### 3.6.2.- ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO ELECTRÓDICO

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 se produce una relación lineal entre la intensidad de pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

Para el estudio de la influencia de la velocidad de barrido en los voltamperogramas cíclicos de la cefepima se emplea una disolución acuosa de concentración  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras se trasvasan a una celda electroquímica donde se pasó nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los voltamperogramas mediante voltamperometría cíclica, realizando un barrido entre 0 y -1.2 V y modificando la velocidad de barrido entre 40 y 800  $mV \cdot s^{-1}$ .

Como ya se indicó en el apartado anterior el voltamperograma solo presenta componente catódico. En la Tabla 3.7 se recogen los valores de intensidad de pico catódicos obtenidos con cada una de las velocidades de barrido aplicadas para la onda de reducción.

Tabla 3.7. Variación de las intensidades de pico con la variación de la  $V_b$ .

$V_b(\text{mV}\cdot\text{s}^{-1})$	$V_b^{1/2}(\text{mV}\cdot\text{s}^{-1})^{1/2}$	$-i_p(10^{-2}\mu\text{A})$
40	6.32	0.188
80	8.94	1.223
100	10.00	1.822
150	12.24	6.447
200	14.14	7.767
300	17.32	10.97
400	20.00	13.67
600	24.49	19.29
800	28.24	25.40

La representación de la intensidad de pico de estas ondas frente a  $V_b^{1/2}$  se muestra en la Figura 3.11.

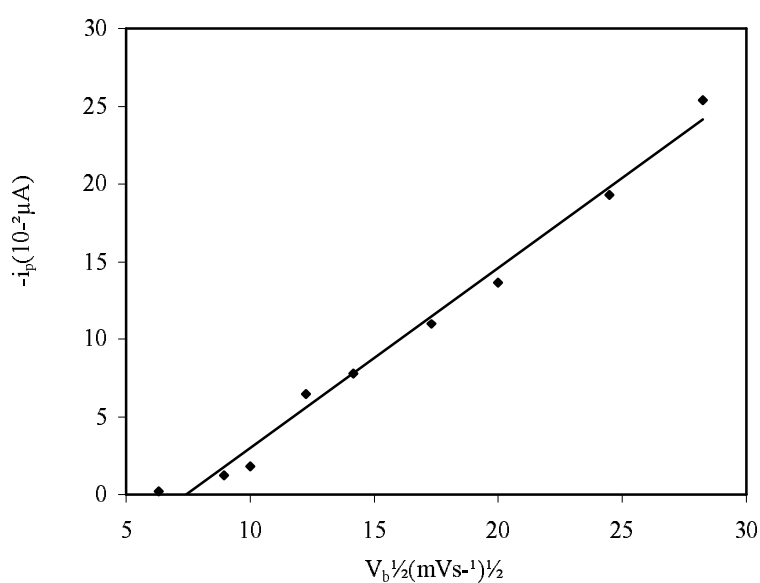


Figura 3.11. Variación de la intensidad de pico con la  $V_b^{1/2}$ .



A la vista de esta representación que muestra la dependencia lineal entre ambas magnitudes para la onda de reducción, se confirma que los procesos responsables de dicha onda están controlados 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:

$$-i_p(\mu\text{A}) = 1.159 \cdot 10^{-2} V_b^{1/2} - 8.612 \cdot 10^{-2} ; r = 0.994$$

La dependencia de la intensidad de pico con el tiempo de goteo permite establecer también la naturaleza de los procesos electroquímicos. En procesos controlados por difusión la relación lineal se produce entre  $t^{2/3}$  y la intensidad de pico.

Para el estudio de la influencia del tiempo de goteo de la cefepima se emplea una disolución acuosa de concentración  $4 \cdot 10^{-5}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras se trasvasan a una celda electroquímica donde se pasa nitrógeno durante diez minutos, registrándose a continuación los polarogramas mediante polarografía diferencial de impulsos, realizando un barrido entre 0 y -1.2 V y modificando el tiempo de goteo entre 0.5 y 2 s.

En la Tabla 3.8 se recogen los valores de intensidad de pico catódico obtenidos en el rango del tiempo de goteo estudiado.

*Tabla 3.8.* Influencia del tiempo de goteo en la onda reducción de la cefepima.

t(s)	$t^{2/3}$	$-i_p (\mu\text{A})$
0.5	0.629	0.117
0.7	0.788	0.240
1	1	0.422
1.5	1.31	0.670
1.7	1.424	0.770
2	1.58	0.879

La representación de la intensidad de pico de estas ondas frente a  $t_g^{2/3}$  se muestra en la Figura 3.12.

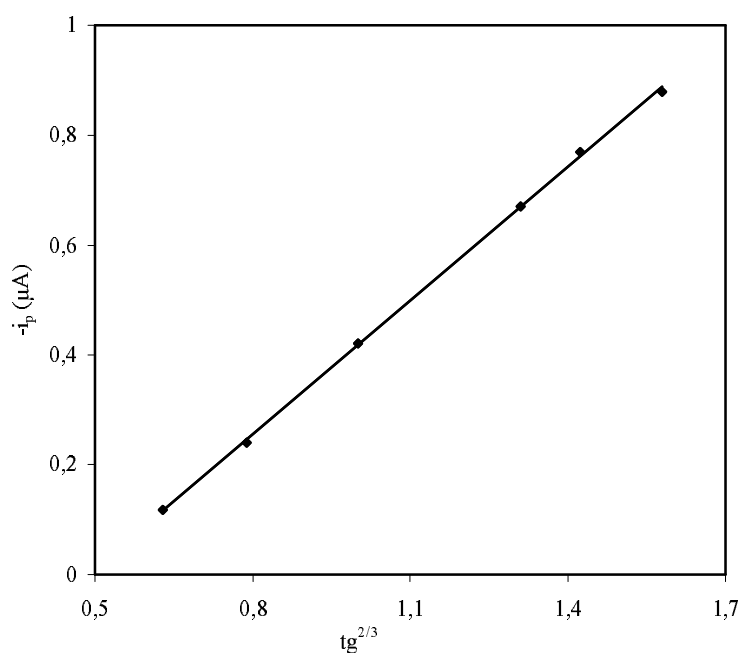


Figura 3.12. Estudio de la influencia del tiempo de goteo sobre la intensidad de pico.

A medida que aumenta el tiempo de goteo, aumenta linealmente la intensidad de pico, siendo su ecuación:

$$-i_p(\mu A) = 8.0810^{-7} t_g^{2/3} - 3.9110^{-7} \quad r = 0.9998$$

El carácter lineal de la anterior representación también indica que la onda de reducción de la cefepima se debe fundamentalmente a un proceso controlado por difusión. Tras este estudio se fija un tiempo de goteo de 1 s para posteriores experiencias.

### 3.7.- DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN Y DEL NÚMERO DE ELECTRONES

Para el cálculo de dicho coeficiente de difusión, se prepararon, en matraces de 25 ml, disoluciones de la cefepima de distintas concentraciones, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7, y registrándose los correspondientes polarogramas realizando un barrido entre 0 y -1.2 V.

En la Tabla 3.9 se exponen los valores de intensidad límite obtenidos para la onda con las distintas concentraciones de la cefepima.

Tabla 3.9. Variación de intensidad límite con la concentración de la cefepima.

C(moles/mm <sup>3</sup> )	-i <sub>l</sub> (μA)
0.001	2.5 10 <sup>-3</sup>
0.002	5.0 10 <sup>-3</sup>
0.003	6.2 10 <sup>-3</sup>
0.004	7.5 10 <sup>-3</sup>
0.012	2.4 10 <sup>-2</sup>
0.021	3.6 10 <sup>-2</sup>
0.042	7.0 10 <sup>-2</sup>

En la Figura 3.13 se representan estos valores, observándose una dependencia lineal entre la intensidad límite y la concentración de la cefepima, que posee un coeficiente de correlación de 0.9993. La ecuación que muestra esta dependencia es la siguiente:

$$-i_l = 1.6511 C + 0.0012$$

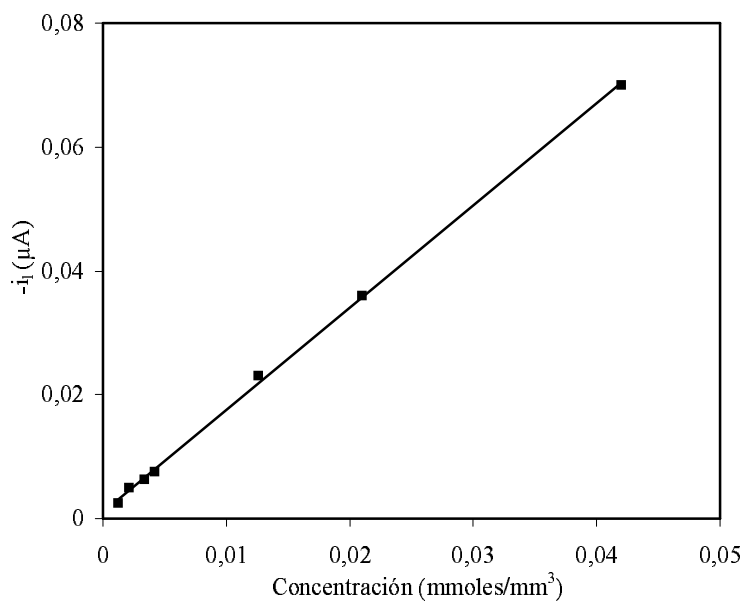


Figura 3.13. Variación de intensidad límite con la concentración de la cefepima pH 2.7.

Sustituyendo el valor de la pendiente en la expresión:

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

se obtiene un valor del coeficiente de difusión de  $3.9 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{sg}$ .

Una vez calculados los potenciales iniciales y finales y el coeficiente de difusión se realiza la cronoculombimetría para una concentración de  $4 \cdot 10^{-2} \text{ moles/mm}^3$  de cefepima a los valores de pH de 2.7 y 6.2. 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  $2nFAD_o^{1/2} C_o^*/\pi^{1/2}$ . Sustituyendo en esta ecuación y despejando n, obtendríamos el número de electrones que participan en el proceso de reducción de la cefepima. En la Tabla 3.9 se muestran los valores calculados para el número de electrones n para la cefepima a cada valor de pH, de los que se deduce que es 2 el número de electrones intercambiados en el proceso.

Tabla 3.10. Cálculo del número de electrones de la cefepima para pH.

pH 2.7		pH 6.2	
Pendiente	n° e <sup>-</sup>	Pendiente	n° e <sup>-</sup>
1.02 10 <sup>-7</sup>	2.3	8.03 10 <sup>-8</sup>	1.80
9.14 10 <sup>-8</sup>	2.05	8.12 10 <sup>-8</sup>	1.84
9.1 10 <sup>-8</sup>	2.04	8.21 10 <sup>-8</sup>	1.82
n° medio de e <sup>-</sup>	2.13 ± 0.14	n° medio de e <sup>-</sup>	1.82 ± 0.02

### 3.8.- MECANISMO DE REDUCCIÓN DE LA CEFEPIMA

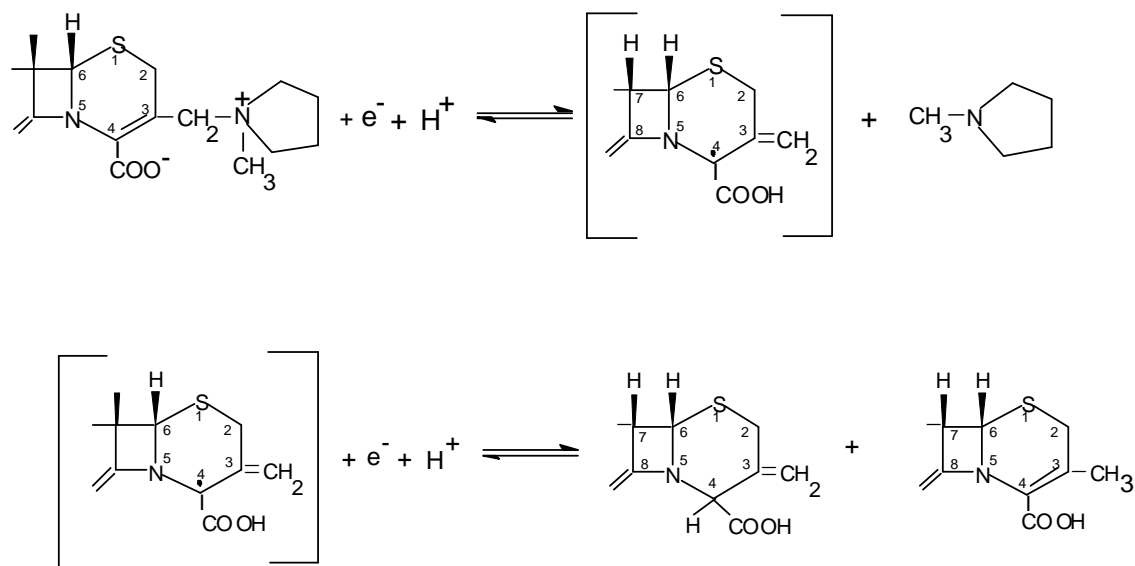
Al objeto de conocer el mecanismo de reducción de la cefepima, para la segunda onda, es necesario calcular el número de protones,  $p$ , que intervienen en el proceso. Estos se calculan a partir del parámetro  $\alpha n$  (1.3), obtenido mediante el análisis logarítmico de la función intensidad-potencial, como se ha estudiado anteriormente.

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

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

Se obtiene un valor de  $p$  (n° de protones) de  $2.3 \pm 0.2$ .

A partir de estos resultados obtenidos, y en base al mecanismo propuesto para compuestos similares [156, 164], el mecanismo mostrado en el Esquema 3.2 puede ser asignado para la reducción de la cefepima para el estudio de la segunda onda.



Esquema 3.1. Mecanismo de reducción para la segunda onda de la cefepima.

Como puede observarse, el mecanismo de reducción que se propone transcurre en dos etapas; en la primera se produce la liberación del grupo metilpirrolidino, consumiéndose un electrón y un protón y obteniéndose un producto intermedio, el cual y en una segunda etapa, sufre una reducción con la intervención de un electrón y un protón, obteniéndose un equilibrio tautomérico entre dos formas.

### 3.9.-RECTA DE CALIBRADO

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

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

donde  $\sigma = e^{\frac{nF\Delta E}{RT^2}}$ , 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.

Si mantenemos constantes todos los parámetros excepto la concentración de especie electroactiva tendremos que, para una onda de difusión,

$$i_p = f(C)$$

Para comprobar esta expresión, se preparan muestras conteniendo cefepima en distintas concentraciones entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda electroquímica donde se desoxigenan pasando nitrógeno durante 10 minutos, registrándose los correspondientes polarogramas entre 0 y -1.20 V, fijando una  $V_b$  de  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y  $\Delta E$  de -100 mV.

En el rango de concentraciones estudiado existe una relación lineal entre la concentración y la intensidad de pico, por lo que el calibrado se realiza para este rango de concentraciones. En la Figura 3.14 se muestra la recta de calibrado obtenida a partir de quintuplicados preparados como anteriormente se indicó.

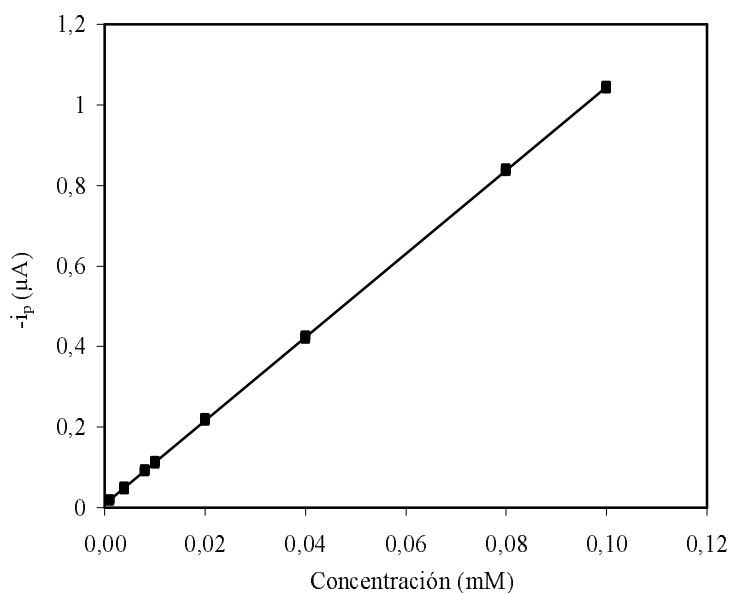


Figura 3.14. Recta de calibrado de la cefepima.

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

$$-i_p = (10.36 \pm 0.03)C + (0.0097 \pm 0.0007); r = 0.999$$

### 3.10. –REPETITIVIDAD

Para conocer la repetitividad intradía del método propuesto se prepararon 10 muestras iguales, conteniendo  $4 \cdot 10^{-5}$  M de cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y registrándose los correspondientes polarogramas como en apartados anteriores, obteniéndose los valores de intensidad de pico perteneciente a la onda de reducción.

El valor medio de la señal ( $y_m$ ) es de  $-4.221 \cdot 10^{-7}$  A, el de la desviación estándar (s) es  $0.059 \cdot 10^{-7}$  A y el de la desviación estándar relativa (%E) 1.4.

Para conocer la repetitividad interdía del método propuesto se preparó y midió una muestra cada día, durante 10 días, conteniendo  $4 \cdot 10^{-5}$  M de la cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y registrándose los correspondientes polarogramas como en apartados anteriores. El valor medio de la señal ( $y_m$ ) es de  $-4.216 \cdot 10^{-7}$  A, el de la desviación estándar (s) es  $0.074 \cdot 10^{-7}$  A y el de la desviación estándar relativa (%E) 1.7.

### 3.11. - LIMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se calculó el límite de detección y de cuantificación, tal y como se describe en el capítulo 2, obteniéndose unos valores de  $9 \cdot 10^{-7}$  M y  $3 \cdot 10^{-6}$  M, respectivamente.



### **3.12.- PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA**

En un matraz de 25 ml se toma una cantidad de la cefepima comprendida entre 14.3-1430  $\mu\text{g}$ , se añaden 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y se enrasa con agua milli-Q. Las muestras se colocan en una celda electroquímica, registrándose los correspondientes polarogramas entre 0 a -1.20 V, después de desoxigenar durante 10 minutos con una corriente de nitrógeno puro, mediante la técnica de polarografía de diferencial de impulsos. Los polarogramas se registran fijando una amplitud de impulso de -100 mV, una velocidad de barrido de  $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  y un tiempo de goteo de 1 s. Por comparación con la correspondiente recta de calibrado obtenida en iguales condiciones, se determina la concentración de la cefepima.

### **3.13.- INTERFERENCIAS**

Las especialidades farmacéuticas de la cefepima se presentan en formulaciones inyectables, ausentes de otros principios activos que pudieran interferir en la determinación electroanalítica de la cefepima. Sin embargo, usualmente la cefepima se administra junto con otros fármacos en el tratamiento de pacientes que cursan con procesos de infecciones severas. Por ello, fue necesario estudiar las posibles interferencias, en la determinación de cefepima, de otros principios activos con los que se suele administrar conjuntamente.

Para ello se prepararon disoluciones de la cefepima de concentración igual a  $4\cdot 10^{-5}$  M, conteniendo además 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7, cantidades crecientes de distintos fármacos y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, de tal manera que la relación cefepima:sustancia interferente (p/p) llegase hasta 1:1000. Las muestras así preparadas, fueron medidas siguiendo el procedimiento recomendado.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.11, tomando como criterio de interferencia un porcentaje de influencia sobre la intensidad de pico superior al 5%. Se puede concluir que la presencia de estos fármacos, que suelen coadministrarse con la cefepima, no afecta a la determinación de la misma por el método propuesto, resultando

ser bastante selectivo, a excepción de rifampicina que interfiere en una relación incluso menor a 1:1.

*Tabla 3.11.* Influencia de distintos fármacos sobre la determinación de la cefepima.

Fármacos	Límite de tolerancia
Amicacina, dipirona, sulbactam, Imipenem-cilastatina	1000
Gentamicina	250
Penicilina, ticarcilina	100
Cloroanfenicol, tobramicina, Amoxicilina-Ac. clavulánico	10
Rifampicina	< 1

### 3.14.- DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA EN ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS

El método propuesto fue aplicado a la determinación del contenido de cefepima en tres especialidades farmacéuticas Maxipime<sup>®</sup> 2g, 1g y 500 mg. Para ello, se disuelve el contenido del vial del fármaco en agua Milli-Q y se determina el contenido en cefepima aplicando el procedimiento propuesto. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 3.12.

*Tabla 3.12.* Resultados de la determinación de la cefepima en tres especialidades farmacéuticas.

Especialidad farmacéutica	Contenido nominal (mg)	DPP* (mg)	HPLC* (mg)	t de Student	Contraste F
Maxipime 0.5	1	0.95±0.04	1.08±0.02	2	4
Maxipime 1.0	5	5.12±0.08	4.86±0.11	2.05	1.89
Maxipime 2.0	10	10.08±0.09	9.84±0.09	1.91	1

\*media ± S<sub>n-1</sub> (n=3)

Los resultados obtenidos por polarografía diferencial de impulsos se compararon con los obtenidos por el método cromatográfico propuesto por Jehl y colaboradores [138]. Tal y como se puede comprobar los valores de  $t$  son menores que el valor crítico, que es de 2.78 ( $P=0.05$ ), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste  $F$  de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 ( $P = 0.05$ ).

### **3.15.- DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

El método propuesto se aplica a la determinación de la cefepima en muestras de orina y suero.

#### **3.15.1.- DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA EN ORINA**

Dado que aproximadamente el 88% de la cefepima suministrada a un paciente se excreta inalterada en la orina, se procedió a aplicar el método propuesto a su determinación en este fluido.

Inicialmente se realizó un estudio para establecer la posible influencia del efecto matriz, mediante la comparación de las pendientes de la recta de calibrado en agua con una recta de adición patrón en orina.

Para preparar la recta de adición patrón en orina, se tomó una alícuota de 2 ml de orina y se transfirió a matraces de 25 ml donde se añadió volúmenes adecuados de cefepima  $10^{-3}$  M para obtener concentraciones finales comprendidas entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M del fármaco, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta enrase. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda electroquímica para medirlas con las condiciones anteriormente establecidas.

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

$$-i_p = (5.06 \pm 0.016)C + (0.15 \pm 0.008); r = 0.995$$

donde  $i_p$  se expresa en  $\mu\text{A}$  y  $C$  en  $\text{mM}$ .

En la figura 3.15 se representa una comparación entre las rectas obtenidas en orina y en agua.

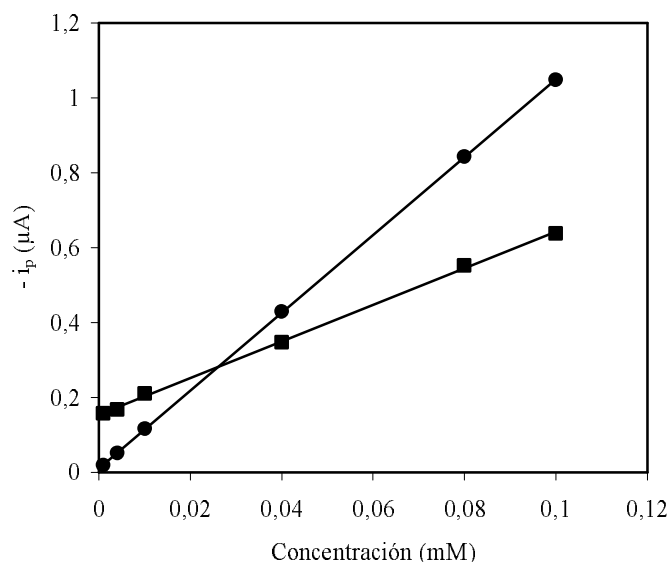


Figura 3.15. Comparación de las rectas de calibrado de la cefepima en orina (■) y en agua (●).

Se realizó un test de comparación de pendientes entre la recta de calibración en agua y la recta de adición patrón en orina usando el test de la  $t$  de Student, con  $(n_1 + n_2 - 4)$  grados de libertad para un nivel de significación del 5%. Se encontró diferencia significativa entre las pendientes,  $t_{\text{calculado}} = 18.92$  y  $t_{\text{tabulado}} = 2.23$ . Esto indica la existencia de un efecto matriz, que se refleja como una disminución de la señal del analito en orina. Como consecuencia la cuantificación de la cefepima en muestras de orina se realizó por el método de adición patrón.

Posteriormente se procedió a realizar la determinación de la cefepima en muestras de orina dopada, para lo que se añadió a muestras de orina cantidades de cefepima para obtener concentraciones finales de  $4 \cdot 10^{-5}$  y  $4 \cdot 10^{-6}$  M, y se trató mediante el método descrito y recomendado anteriormente, realizando tres determinaciones para cada nivel de concentración. Las recuperaciones para las diferentes concentraciones fue

de 98.2 y 98.6%, con desviaciones estándar de 2.1 y 1.9%, respectivamente. De todo ello se concluye que el método es bastante sensible para medir concentraciones más bajas que las que habitualmente se presentan después de administrar dosis terapéuticas.

Igualmente, se aplicó el procedimiento descrito a la determinación de cefepima en muestras reales de orina correspondientes a los pacientes 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 descritos en la presente memoria (pág. 212), validándose por el método cromatográfico propuesto por Jehl y colaboradores [138]. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13 Concentración de la cefepima en muestras de orina correspondientes a distintos pacientes.

Paciente		Cefepima (mg/l)* por DPP	Cefepima (mg/l)* por HPLC	t de Student	Contraste F
5		2997 ± 1.7	3000 ± 1.8	1.8	1.12
6	antes administración	1057 ± 1.1	1060 ± 1.8	2.5	2.67
	posterior administración	1114 ± 1.2	1112 ± 0.9	2.44	1.77
7	posterior administración	68 ± 0.9	69.2 ± 0.8	1.76	1.26
8	antes administración	249.6 ± 0.2	250.5 ± 0.1	1.95	2.04
	posterior administración	273 ± 1.4	270.7 ± 2	1.64	2.04
9	antes administración	350 ± 0.9	349.2 ± 0.	1.17	1.26
	posterior administración	138.7 ± 0.9	140.4 ± 1.1	2.13	1.5
10	antes administración	701.4 ± 1	699.1 ± 1.2	2.56	1.44
	posterior administración	353.9 ± 0.9	355.5 ± 0.7	2.55	1.65
11	antes administración	103 ± 0.8	104 ± 0.6	1.75	1.77
	posterior administración	1461.9 ± 0.9	1459.4 ± 1.9	2.08	4.45
12	antes administración	3591 ± 2	3587.8 ± 2.1	1.92	1.1
	posterior administración	1195.7 ± 1.7	1193.1 ± 1.8	1.81	1.12

\* media ± s<sub>n-1</sub> (n=3)

La comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos muestran unos valores de  $t$  menores que el valor crítico, que es de 2.78 ( $P = 0.05$ ), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste  $F$  de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 ( $P = 0.05$ ).

### **3.15.2.- DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA EN SUERO HUMANO**

La determinación de la cefepima en suero humano requiere un paso previo de extracción antes de realizar la medida por polarografía diferencial de impulsos. Para ello, una alícuota de 0.5 ml de muestra de suero humano se mezcla con un volumen igual de acetonitrilo en un tubo de centrífuga de 15 ml. El tubo se agita vigorosamente con un agitador mecánico durante 5 minutos, y posteriormente se centrifuga a 5000 x g durante 10 minutos. El líquido sobrenadante se transfiere, con ayuda de una pipeta Pasteur, a otro tubo de centrífuga de 15 ml, al que se le añade 3.2 ml de diclorometano. Después se agita durante 5 min en agitador mecánico y durante 10 minutos en centrifugadora a 5000 x g. Toda la fase acuosa superior formada se transfiere a un matraz de 25 ml, al que se le añade 5 ml de tampón fosfato a pH 2.7 y se enrasa con agua Milli-Q.

Inicialmente se realizó un estudio para establecer la posible influencia del efecto matriz, mediante la comparación de las pendientes de la recta de calibrado en agua con una recta de adición patrón en suero.

Para preparar la recta de adición patrón en suero, se toman los extractos acuosos de los tubos y se transfieren a matraces de 25 ml donde se añadió cantidades adecuadas de cefepima  $10^{-3}$  M para obtener concentraciones finales comprendidas entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  M del fármaco, 5 ml de tampón fosfato de pH 2.7 y agua Milli-Q hasta enrase. Las muestras así preparadas se llevan a una celda electroquímica para medirlas con las condiciones anteriormente establecidas. En la figura 3.16 se representa la recta obtenida a partir de triplicados preparados.

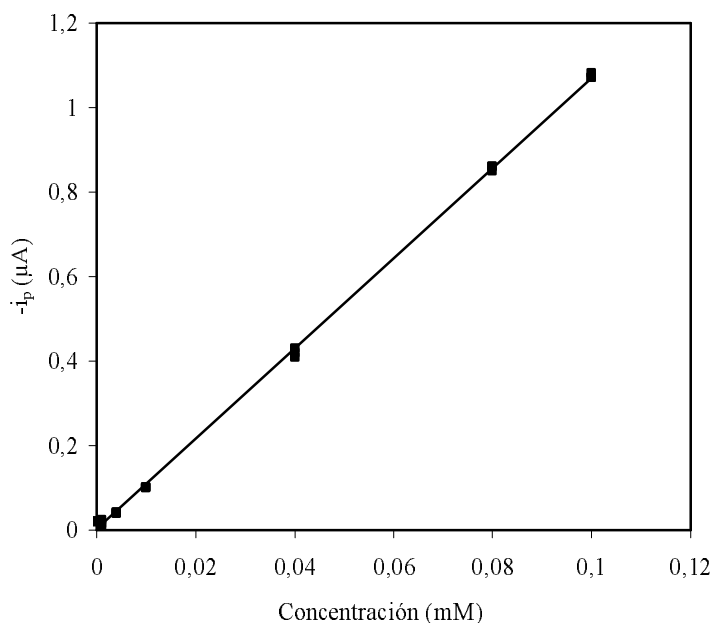


Figura 3.16. Recta de calibrado de la cefepima en suero.

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

$$-i_p = (10.66 \pm 0.05)C + (0.0033 \pm 0.0009); r = 0.999$$

donde  $i_p$  se expresa en  $\mu\text{A}$  y  $C$  en  $\text{mM}$ .

Se realizó un test de comparación de pendientes entre la recta de calibración en agua y la recta de adición patrón en suero usando el test de la  $t$  de Student, con  $(n_1 + n_2 - 4)$  grados de libertad para un nivel de significación del 5%. Dado que no se encontró diferencia significativa entre las pendientes ( $t_{\text{calculado}} = 0.17$  y  $t_{\text{tabulado}} = 2.23$ ), la cuantificación de la cefepima en muestras de suero se realizará utilizando la recta de calibración externa.

Posteriormente se procedió a realizar la determinación de la cefepima en muestras de suero dopado, para lo que se añadió a muestras de suero cantidades de cefepima para obtener concentraciones finales de  $4 \cdot 10^{-5}$  y  $4 \cdot 10^{-6}$  M, y se trató mediante el método descrito y recomendado anteriormente, realizando tres determinaciones para cada nivel de concentración. Las recuperaciones para las diferentes concentraciones fue

de 97.9 y 98%, con desviaciones estándar de 2 y 2.5%, respectivamente. El método es bastante sensible para medir concentraciones más bajas que las que habitualmente se presentan después de administrar dosis terapéuticas.

Se determinó la concentración de la cefepima en una muestra de suero en un paciente tratado con Maxipime<sup>®</sup> intravenoso con una dosis de 1 g cada 8 horas. Se trató la muestra tal y como se ha propuesto anteriormente y se midió por triplicado, validándose por el método cromatográfico propuesto por Jehl y colaboradores [138]. La concentración de la cefepima encontrada en la muestra de suero fue de  $34.53 \pm 0.17$  ppm por polarografía diferencial de impulsos, y la encontrada por HPLC fue de  $34.60 \pm 0.16$  ppm.

Para validar el procedimiento propuesto se aplicó el test de significación de t de Student, donde s posee un valor de 0.164 y t tiene ( $n_1 + n_2 - 2$ ) grados de libertad. De esta forma se obtiene un valor de t de  $-0.52$ , que al ser menor que el valor crítico de t, que es de 2.78 ( $P = 0.05$ ), se acepta que no existe diferencias, estadísticamente, entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste F para comparar desviaciones estándar, obteniéndose un valor de 1.12 que es inferior al crítico, que es de 39 ( $P = 0.05$ ).

También se determinó las concentraciones de la cefepima en muestras de suero correspondientes a los pacientes 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 descritos en la presente memoria (pág. 212), tomadas a los 30 minutos de la administración. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 3.14.



Tabla 3.14. Concentración de la cefepima en muestras de suero correspondiente a varios pacientes.

Paciente	Cefepima (mg/l)* por DPP	Cefepima (mg/l)* por HPLC	t de Student	Contraste F
5	42.1 ± 0.9	43 ± 0.4	1.7	5.06
6	80 ± 0.9	79.9 ± 0.6	0.14	2.45
7	64.8 ± 0.8	65.5 ± 0.4	1.38	3.2
8	67.2 ± 1.6	69.1 ± 1.3	1.6	1.51
9	118.4 ± 1	116.7 ± 0.6	2.53	2.63
10	76.7 ± 3	78 ± 2.6	0.56	1.33
11	115.1 ± 2.2	116.8 ± 1.8	1.06	1.46
12	101.1 ± 2.3	103.8 ± 2	1.56	1.33

\*media±S<sub>n-1</sub> (n=3)

La comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos muestran unos valores de t menores que el valor crítico, que es de 2.78 ( $P = 0.05$ ), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 ( $P = 0.05$ ).

### 3.16.- ESTABILIDAD

Debido al gran uso de la cefepima a nivel hospitalario y su administración junto a otros fármacos disueltos en suero fisiológico, se consideró importante realizar un estudio de estabilidad de la cefepima con el tiempo en este medio.

Para ello, se prepararon disoluciones de cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M en la que se añadieron 5 ml de tampón fosfato pH 2.7 y se enrasó con suero fisiológico a 25 ml. Posteriormente se midieron, a distintos tiempos, por polarografía diferencial de impulso mediante el procedimiento recomendado.

En la Figura 3.17, se representa la estabilidad de la cefepima en suero fisiológico a tres temperaturas distintas de 20, 30 y 40° C.

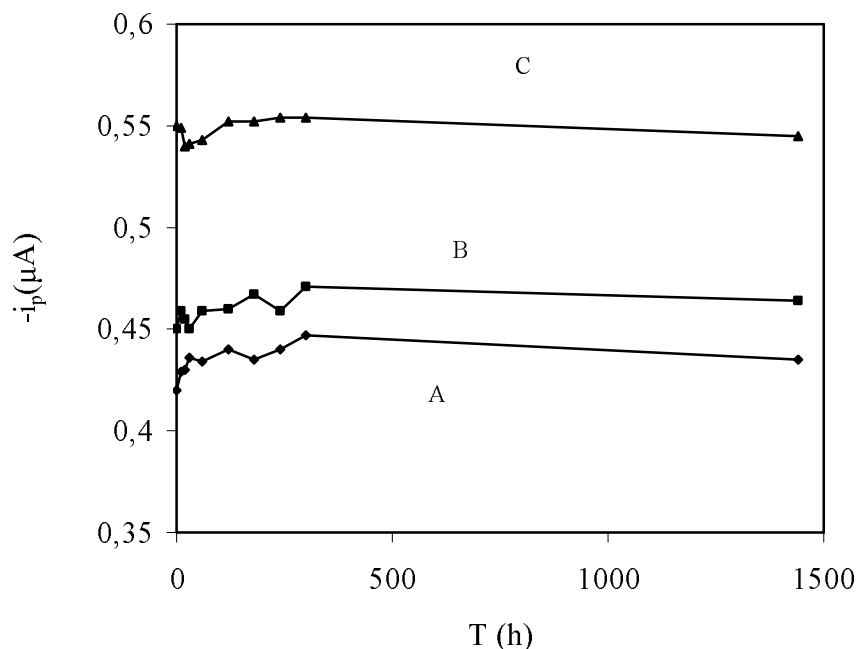


Figura 3.17. Estabilidad de la cefepima en suero fisiológico a distintas temperaturas: (A) 20°C, (B) 30°C, (C) 40°C.

Como puede observarse, existe una gran estabilidad de la cefepima en suero fisiológico durante las 24 horas que ha durado el estudio.

También se realizó un estudio de estabilidad durante 24 horas, en suero fisiológico, de la cefepima en asociación con otros fármacos. En la Tabla 3.22 se recoge la concentración de los distintos fármacos que se asociaron a la cefepima ( $4 \cdot 10^{-5}$  M) y el comportamiento de las mezclas. El criterio de estabilidad fue una diferencia en la intensidad de corriente mayor del 5% que a tiempo cero.

Tabla 3.22. Estabilidad de la cefepima asociada a otros fármacos.

Fármacos	Especialidad farmacéutica	Concentración ( $10^{-5}$ M)	Comportamiento
Imipenem/cilastatina	Tienam	1.8/1.48	Estable
Ticarcilina	Ticarpén	2.67	Estable*
Tobramicina	Tobradistin	0.2	Estable
Cloramfenicol	Normofenicol	2.5	Estable
Dipirona	Nolotil	6.8	Estable
Penicilina G sodio	Penicilina G	8	Estable*
Sulbactam	Betamaz	54.6	Estable
Amoxicilina/ Ac. Clavulánico	Augmentine	1.3/0.33	Estable
Amicacina	Sustancia valorada	0.42	Estable
Amicacina	Biclin	0.42	Estable
Gentamicina	Gevramycin	0.4	Estable**
Tramadol	Adolonta	0.36	Estable

\* Estable durante 6 horas

\*\* Estable durante 2 horas

## **CAPÍTULO 4**

---

### **DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA POR VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ADSORTIVA CATÓDICA**

En este capítulo se describe el estudio de la adsorción y posterior reducción de la cefepima en el electrodo de gota de mercurio estática (SMDE), que permite la determinación de este fármaco en diferentes fluidos biológicos por voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica (CAdSV).

#### 4.1.- ESTUDIOS PREVIOS

Con el objeto de establecer si la cefepima se adsorbe sobre la superficie del mercurio se registraron voltamperogramas cíclicos con y sin deposición previa sobre la superficie de un electrodo de gota de mercurio estática. Para ello, se prepararon disoluciones acuosas de la cefepima de concentración  $10^{-7}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y se registraron los voltamperogramas correspondientes a una velocidad de barrido de 1 V/s. En la Figura 4.1, se muestran los voltamperogramas obtenidos a distintos tiempos de deposición y un potencial de acumulación de 0 V. Como puede observarse la diferencia de intensidad entre los voltamperogramas indica la existencia de una acumulación de la cefepima sobre la superficie del electrodo.

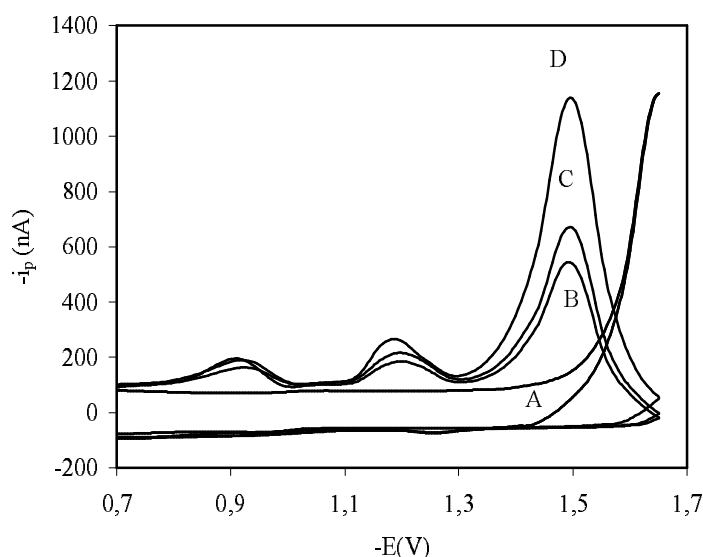


Figura 4.1. Voltamperogramas cíclicos de la cefepima con:  
(A) sin deposición, (B) 60 s, (C) 90 s y (D) 240 s de tiempo de deposición.

Posteriormente y 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 4.2, se encuentra representado el voltamperograma correspondiente a la voltamperometría de barrido lineal pertenecientes a una muestra que contenía 1.43  $\mu\text{g}$  de cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Una vez preparada la muestra, se trasvasó a la celda electroquímica donde se le hizo pasar una corriente de nitrógeno puro durante 10 minutos, tras lo cual se dispusieron las condiciones necesarias para la medida y registro de los voltamperogramas. El barrido se realizó desde 0 hasta -1.4 V, utilizándose un potencial de acumulación de 0 V, un tiempo de deposición de 60 s y un tiempo de reposo de 15 s.

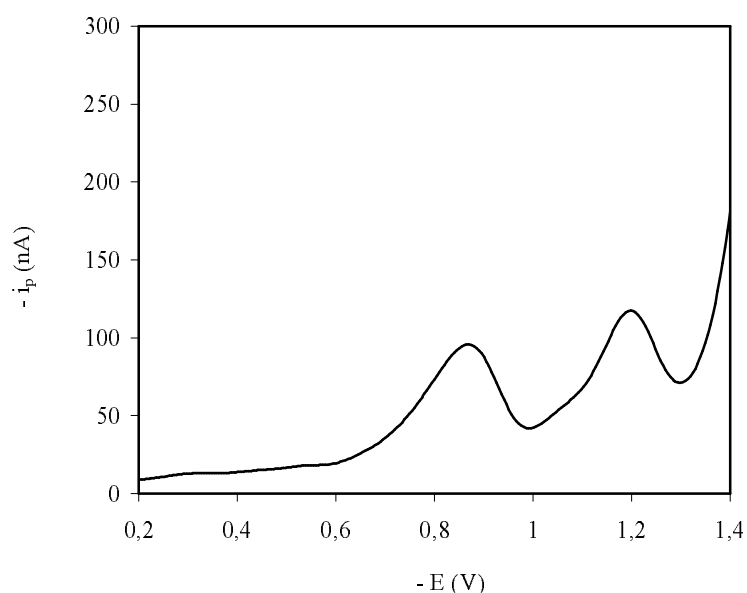


Figura 4.2. Voltamperograma de barrido lineal de cefepima  $10^{-7}$  M a pH 5.8.

Como puede observarse aparecen dos ondas de reducción para la cefepima a potenciales de -0.89 V y -1.2 V. El estudio voltamperométrico se centró, al igual que en el estudio por polarografía diferencial de impulsos, en la onda II debido a su mejor definición.

## 4.2.- INFLUENCIA DEL pH

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones acuosas de cefepima  $10^{-7}$  M a distintos valores de pH entre 2 y 11.5, añadiendo volúmenes variables de ácido fosfórico 1 M e hidróxido potásico 1 M hasta un volumen total de 5 ml, y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Posteriormente se registraron los correspondientes voltamperogramas entre 0 y -1.5 V, utilizando un potencial de acumulación de 0 V, un tiempo de deposición de 60 s y un tiempo de reposo de 15 s.

En la Figura 4.3 se representan los voltamperogramas de la cefepima a tres valores de pH característicos. Se elige un pH de 5.8, en los siguientes estudios, ya que a este valor de pH los voltamperogramas están mejor definidos.

El gráfico muestra tres voltamperogramas (A, B y C) de cefepima a una concentración de  $10^{-7}$  M. El eje vertical representa la corriente  $i / \mu A$  y el eje horizontal representa el potencial  $E / V$ . Las curvas corresponden a pH 2 (A), 5.8 (B) y 9 (C). La curva A muestra una gran corriente de fondo y una onda de reducción poco definida. La curva B muestra una onda de reducción bien definida con un pico a aproximadamente -1.25 V. La curva C muestra una onda de reducción bien definida con un pico a aproximadamente -1.35 V.

Figura 4.3. Voltamperogramas de cefepima  $10^{-7}$  M a distintos pH: (A) 2; (B) 5.8; (C) 9.

## 4.3.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Se estudió el comportamiento de la segunda onda de reducción de la cefepima frente a la temperatura del sistema electroquímico. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones acuosas de cefepima  $10^{-7}$  M de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta

completar un volumen de 25 ml, y se varió la temperatura desde 25 hasta 60 °C. Posteriormente se registraron los correspondientes voltamperogramas entre 0 y -1.5 V, utilizando un potencial de acumulación de 0 V, un tiempo de deposición de 60 s y un tiempo de reposo de 15 s.

En la Figura 4.4 se representa la influencia de la temperatura sobre la intensidad de pico de la cefepima. Los estudios posteriores se realizan a 25 °C.

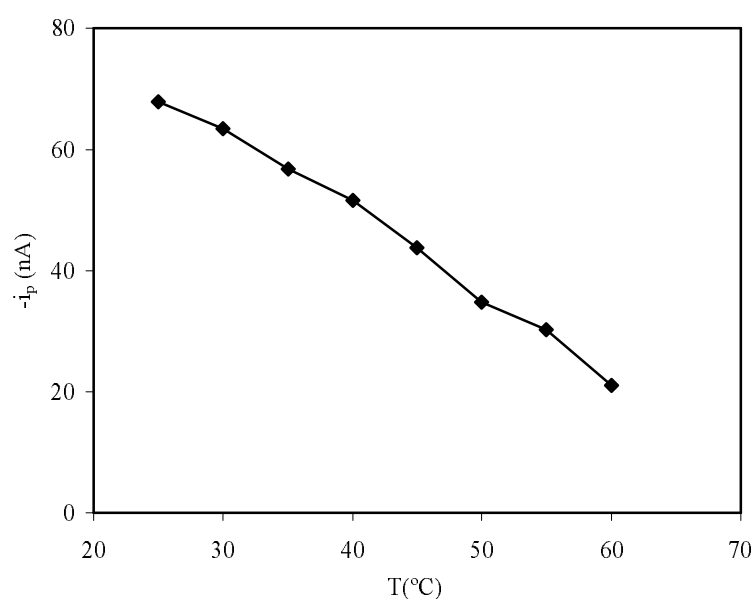


Figura 4.4. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de pico de la cefepima.

#### 4.4.- INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN

Se prepararon disoluciones acuosas de cefepima de concentración  $10^{-7}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y se registraron los voltamperogramas correspondientes entre 0 y -1.4 V, variando el potencial de acumulación entre -1 V y 0.1 V, y manteniendo el tiempo de deposición en 60 s y el tiempo de reposo en 15 s.

En la Tabla 4.1 aparecen los valores de intensidad y potencial de pico correspondientes a los valores de potencial de acumulación.



Tabla 4.1. Variación de las intensidades y potenciales de pico con la variación del potencial de acumulación.

$E_{ac}$ (V)	$-i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
-1.0	13.93	1.20
-0.8	28.83	1.20
-0.6	40.84	1.20
-0.5	66.05	1.20
-0.4	75.58	1.20
-0.3	81.50	1.20
-0.2	77.10	1.20
-0.1	76.96	1.20
0.0	67.65	1.20
0.1	38.10	1.20

En la Figura 4.5 se han representado los valores de las intensidades de pico frente a los valores aplicados de potencial de acumulación. Como puede observarse, en el rango que se extiende desde -0.4 V a -0.1 V, se obtienen los mayores valores de intensidad de pico. Por ello, se va a elegir un potencial de acumulación de -0.3 V en los siguientes estudios.

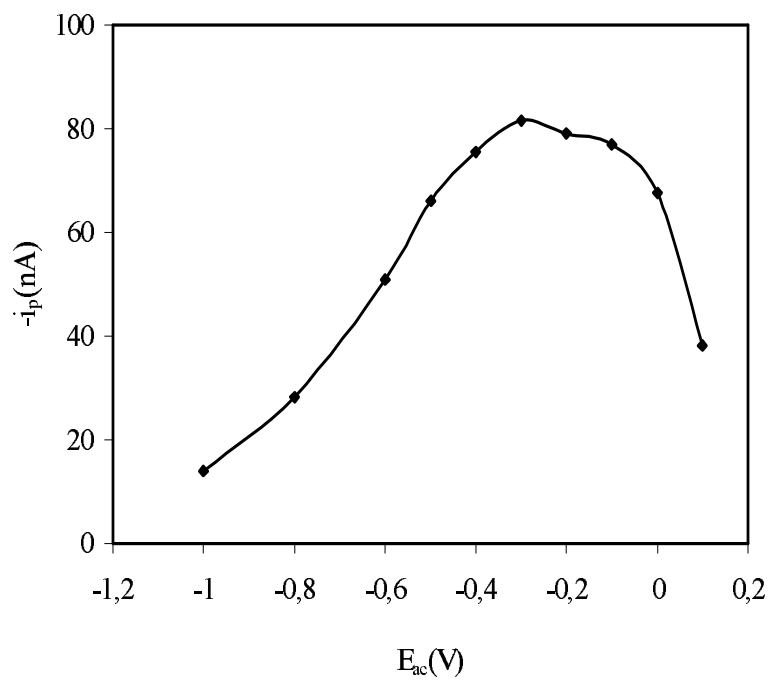


Figura 4.5. Variación de la intensidad de pico de la cefepima en función del potencial de acumulación.

#### 4.5.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE DEPOSICIÓN

Para realizar este estudio se prepararon disoluciones de cefepima de  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y se registraron los voltamperogramas correspondientes entre 0 y -1.4 V, variando el tiempo de deposición entre 0 y 600 s, y manteniendo el potencial de acumulación en -0.3 V y el tiempo de reposo en 15 s. En la Figura 4.6 se representa los voltamperogramas de una disolución de cefepima  $10^{-7}$  M a distintos tiempos de deposición.

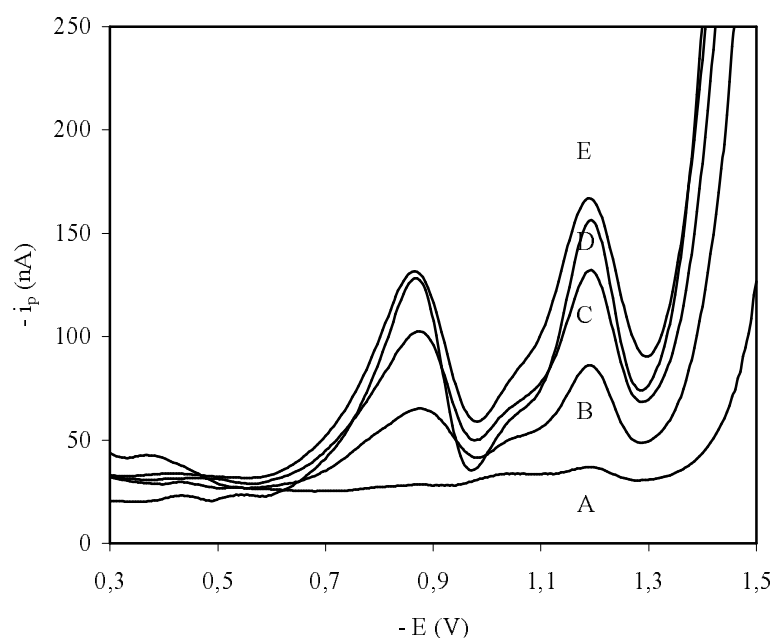


Figura 4.6. Voltamperogramas de cefepima  $10^{-7}$  M a distintos tiempos de deposición: (A) 0 s, (B) 30 s, (C) 60 s, (D) 90 s, (E) 120 s.

En la Figura 4.7 se han representado los valores de las intensidades de pico frente a los valores de tiempo de deposición aplicados, para diferentes concentraciones de cefepima. Se observa que para cada concentración existe una zona de aumento lineal de la intensidad de pico con respecto al tiempo de deposición, y una zona en la cual se pierde esta linealidad debido a la saturación de la gota de mercurio. Se elige, para estudios posteriores, un tiempo de deposición de 120 s.

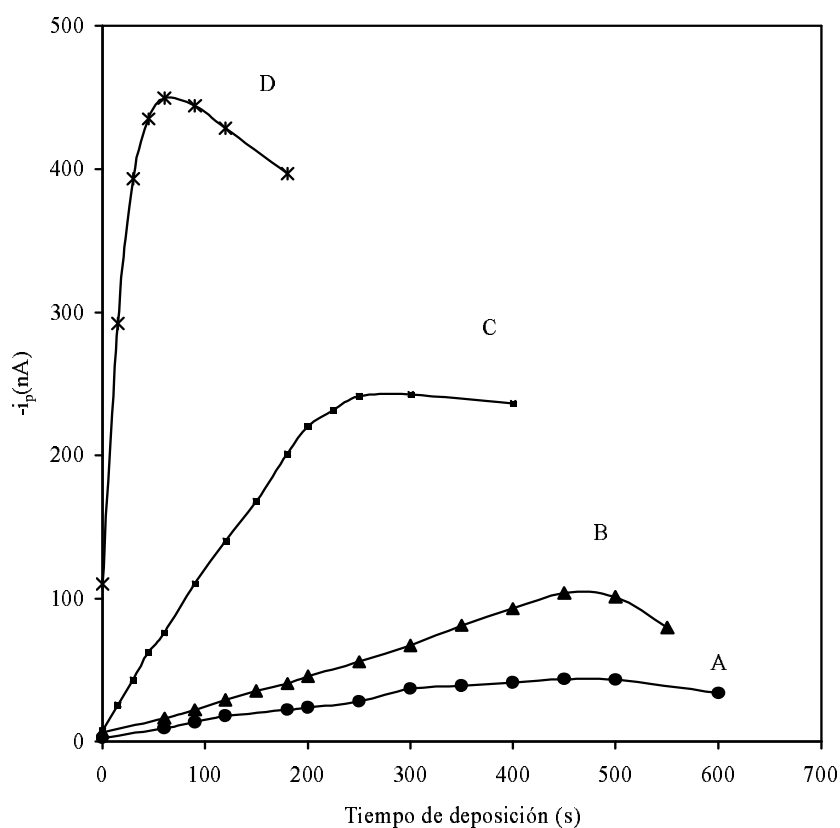


Fig. 4.7. Influencia del tiempo de deposición sobre la intensidad de pico de la cefepima: (A)  $10^{-9}$  M, (B)  $10^{-8}$  M, (C)  $10^{-7}$  M, (D)  $10^{-6}$  M.

#### 4.6.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REPOSO Y LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN

Para estudiar la influencia del tiempo de reposo en la voltamperometría de redisolución de la cefepima se prepararon disoluciones acuosas de cefepima de concentración  $10^{-7}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y se registraron los voltamperogramas correspondientes entre 0 y -1.4 V, variando el tiempo de reposo entre 5 y 30 s, y manteniendo el potencial de acumulación en -0.3 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 representados en la Tabla 4.2. Se observa, que en el rango estudiado del tiempo de reposo, no existen grandes variaciones

con respecto a la intensidad y al potencial de pico. Para estudios posteriores se elige 15s como tiempo de reposo.

*Tabla 4.2.* Valores de intensidad y potencial de pico correspondientes a distintos tiempos de reposo.

<b>Tiempo de Reposo (s)</b>	<b>-i<sub>p</sub> (nA)</b>	<b>-E<sub>p</sub> (V)</b>
5	148.4	1.21
10	155.8	1.20
15	156.3	1.20
30	155.5	1.20

Otro parámetro estudiado fue la velocidad de agitación durante la etapa de deposición de la cefepima. El polarógrafo dispone de 6 velocidades de agitación diferentes; desde 500 hasta 3000 r.p.m. Para el estudio de este parámetro se siguió el procedimiento anteriormente descrito.

En la Figura 4.8 se muestran los resultados obtenidos. Se elige una velocidad de agitación de 2500 r.p.m. para realizar los estudios posteriores.

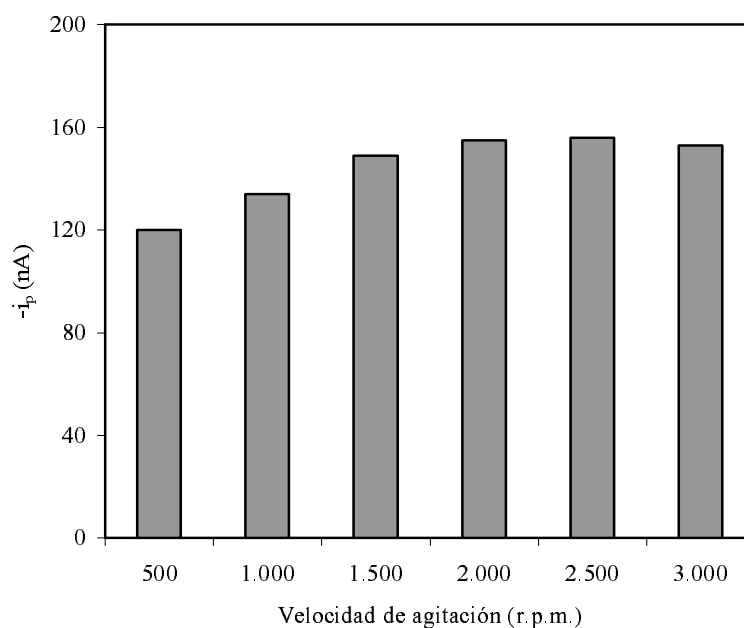


Figura 4.8. Efecto de la velocidad de agitación.

#### 4.7.- INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE BARRIDO

Para estudiar la influencia de la velocidad de barrido de potencial en la voltamperometría de redisolución de cefepima se prepararon disoluciones acuosas de cefepima de una concentración  $10^{-7}$  M, conteniendo 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Se registraron los voltamperogramas correspondientes entre 0 y -1.4 V, variando la velocidad de barrido entre 10 y 1000 mV/s, y manteniendo el potencial de acumulación en un valor de -0.3 V, el tiempo de deposición en 120 s y el tiempo de reposo en 15 s.

En la tabla 4.3, se encuentran recogidos los valores correspondientes a la velocidad de barrido ( $V_b$ ) y su logaritmo, la intensidad de pico ( $i_p$ ) y su logaritmo y el potencial de pico (E). En la Figura 4.9 se representan el log de  $i_p$  y el potencial de pico frente al log de  $V_b$ . Como puede apreciarse, el logaritmo de  $i_p$  aumenta con la  $V_b$  y E disminuye linealmente cuando aumenta el logaritmo de  $V_b$ , con coeficientes de correlación de 0.9995 y 0.9992, respectivamente. Los estudios posteriores se realizan a una velocidad de barrido de 500 mV/s.

Tabla 4.3. Influencia de la velocidad de barrido.

$v_b$ (mV/s)	$\log v_b$ (mV/s)	$-i_p$ (nA)	$-\log i_p$ (nA)	$-E_p$ (V)
10	1	1.58	0.20	1.07
20	1.3	3.20	0.50	1.09
50	1.7	7.91	0.89	1.12
100	2	14.82	1.17	1.14
200	2.3	27.23	1.43	1.17
500	2.7	74.09	1.86	1.20
750	2.87	113.40	2.05	1.21
1000	3	157.20	2.19	1.22

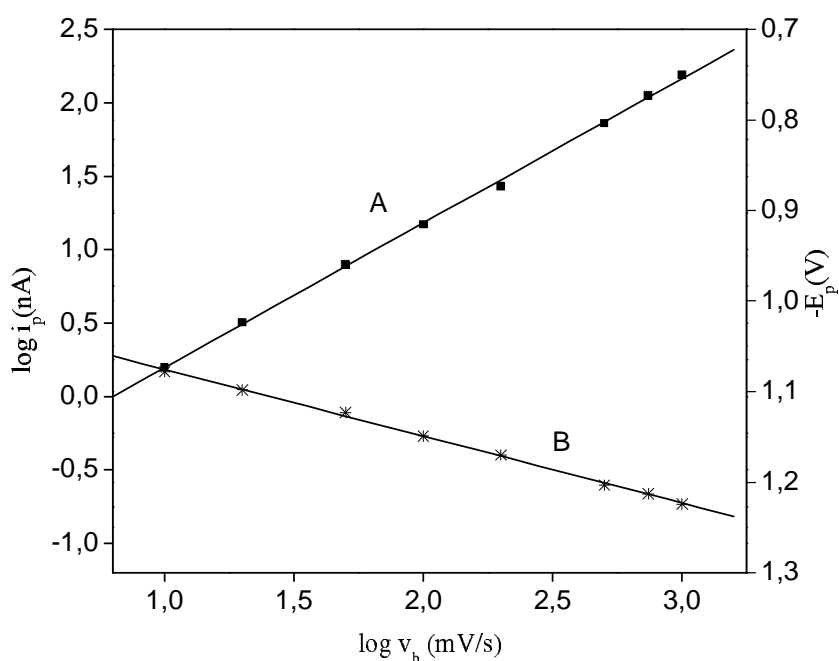


Figura 4.9. Influencia de la velocidad de barrido con: (A)  $\log i_p$ , (B)  $E_p$ .

#### 4.8.- 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 (potencial de acumulación de -0.3 V, tiempo de deposición de 120 s, tiempo de reposo de 15 s y velocidad de barrido de 500 mV/s). Para ello, se prepararon muestras conteniendo cefepima de distintas concentraciones entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  M, 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda electroquímica donde se desoxigenan pasando nitrógeno durante 10 minutos, registrándose los correspondientes voltamperogramas entre 0 y -1.4 V.

En el rango de concentraciones estudiado existe una relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración, por lo que el calibrado se realiza para este rango de concentraciones. En la Figura 4.10 se muestra la recta de calibrado obtenida a partir de triplicados preparados como se indica anteriormente.

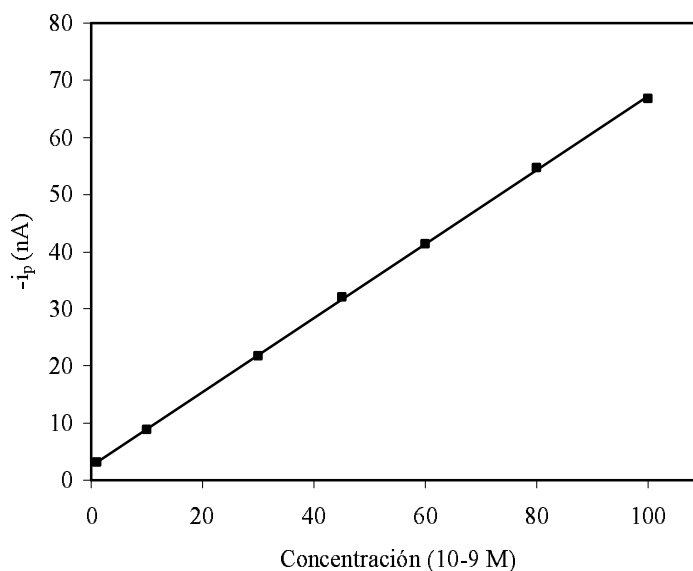


Figura 4.10. Recta de calibrado de la cefepima.

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

$$-i_p = (0.65 \pm 0.006) C + (2.1 \pm 0.3); r = 0.9991$$

donde  $i_p$  se expresa en nA y C en  $10^{-9}$  M.

#### 4.9.- REPETITIVIDAD

Para conocer la repetitividad intradía del método propuesto se prepararon 10 muestras iguales conteniendo  $10^{-7}$  M de la cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y registrándose los correspondientes voltamperogramas como en apartados anteriores. Los parámetros estadísticos calculados presentan un valor medio de la señal ( $y_m$ ) de  $-7.351 \cdot 10^{-8}$  M, una desviación estándar (s) de  $0.55 \cdot 10^{-9}$  M y una desviación estándar relativa (%E) de 0.75.

Para conocer la repetitividad interdía del método propuesto se preparó y midió una muestra cada día, durante 10 días, conteniendo  $10^{-7}$  M de cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y se registró los correspondientes voltamperogramas como en apartados anteriores. El valor medio de la señal ( $y_m$ ) es de  $-7.487 \cdot 10^{-8}$  A, el de la desviación estándar (s)  $0.7 \cdot 10^{-9}$  A, y el de la desviación estándar relativa (%E) 0.93.

#### 4.10.- LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se calculó el límite de detección y de cuantificación, tal y como se describe en el capítulo 2, obteniéndose unos valores de  $4.8 \cdot 10^{-10}$  M y de  $1.6 \cdot 10^{-9}$  M, respectivamente.



#### **4.11.- PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA**

En un matraz de 25 ml se ponen concentraciones de la cefepima comprendidas entre  $10^{-9}$  y  $10^{-7}$  M, se añaden 5 ml de tampón fosfato de pH 5.8 y se enrasa con agua Milli-Q. Las muestras se colocan en una celda electroquímica, registrándose los correspondientes voltamperogramas entre 0 a -1.40 V, después de desoxigenar durante 10 minutos con una corriente de nitrógeno puro, mediante la técnica de voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica de barrido lineal. Los voltamperogramas se registran fijando un potencial de acumulación de -0.3 V, un tiempo de deposición de 120 s con una velocidad de agitación de 2500 rpm, un tiempo de reposo de 15 s y una velocidad de barrido de  $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Por comparación con la correspondiente recta de calibrado obtenida en iguales condiciones, se determina la concentración de la cefepima.

#### **4.12.- DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

El método propuesto se aplica a la determinación de cefepima en orina y líquido cefalorraquídeo.

##### **4.12.1.- DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN ORINA**

Dado que aproximadamente el 88 % de la cefepima suministrada a un paciente se excreta inalterada en orina, se procedió a aplicar el método propuesto a su determinación en este fluido.

Inicialmente se realizó un estudio para establecer la posible influencia del efecto matriz, mediante la comparación de las pendientes de la recta de calibrado en agua con una recta de adición patrón en orina.

Para preparar la recta de adición patrón en orina, se tomó una alícuota de 5 ml de orina que se diluyó con agua a 25 ml en un matraz. Una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  de esta disolución se transfirió a matraces de 25 ml donde se añadieron cantidades adecuadas de cefepima  $10^{-6}$  M para obtener concentraciones finales comprendidas entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$  M

del fármaco, 5 ml de tampón fosfato a pH 5.8 y agua Milli-Q hasta enrase. Las muestras así preparadas son llevadas a una celda electroquímica para realizar las medidas en las condiciones anteriormente establecidas. En la Figura 4.11 se representa la recta obtenida a partir de triplicados preparados, como se indicó anteriormente.

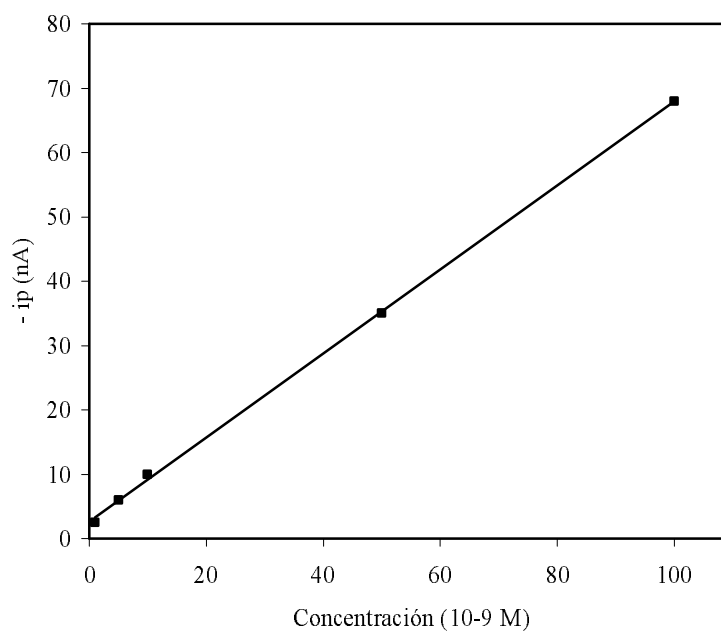


Figura 4.11. Recta de adición patrón en orina.

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

$$-i_p = (0.65 \pm 0.006)C + (2.5 \pm 0.4); r = 0.999$$

donde  $i_p$  se expresa en nA y  $C$  en  $10^{-9}$  M.

Como puede observarse las pendientes de las rectas son iguales, por lo que la cuantificación de la cefepima en muestras de orina se realizará utilizando la recta de calibración en agua.

En la Figura 4.12 se muestra distintos voltamperogramas de cefepima en orina, donde se puede observar que el potencial de pico aparece a  $-1.198\text{ V}$ .

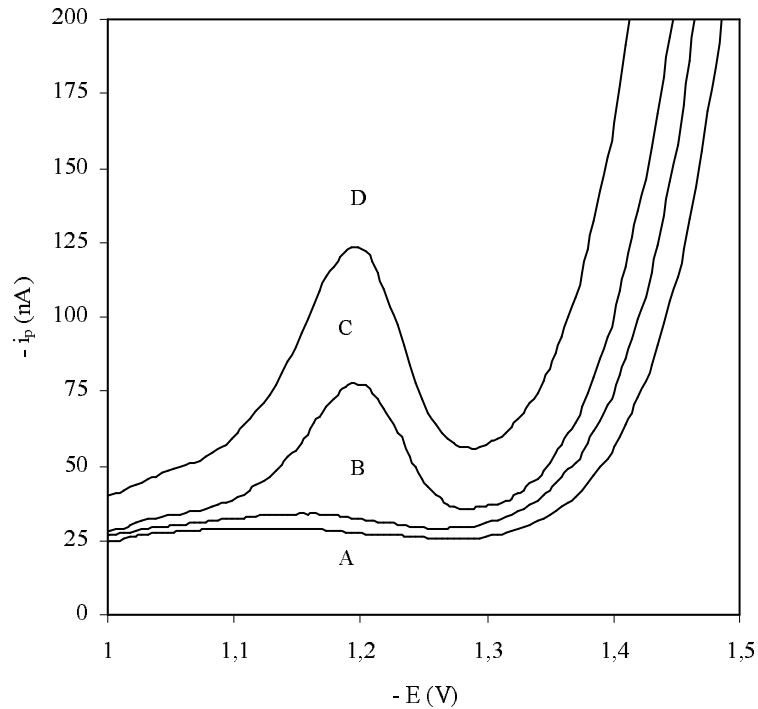


Fig. 4.12. Voltamperogramas de cefepima en orina:  
(A) 0M, (B)  $10^{-9}$  M, (C)  $5 \cdot 10^{-8}$  M, (D)  $10^{-7}$  M.

Posteriormente se procedió a realizar la determinación de cefepima en muestras de orina dopada, para lo que se añadió a muestras de orina cantidades de cefepima para obtener concentraciones  $5 \cdot 10^{-9}$  M y  $5 \cdot 10^{-8}$  M y se siguió el procedimiento descrito, realizando tres determinaciones para cada nivel de concentración. Las recuperaciones para las anteriores concentraciones fue de 98 % y 99.1 %, con desviaciones estándar de 1.5 y 2.8 %, respectivamente. De todo ello se concluye que el método es bastante sensible para medir concentraciones más bajas que las que habitualmente se presentan después de administrar dosis terapéuticas.

Se determinó la concentración de cefepima en una muestra de orina en un paciente tratado con Maxipime<sup>®</sup> intravenoso con una dosis de 2 g cada 12 horas. Se trató la muestra tal y como se ha propuesto anteriormente y se midió por triplicado, validándose por el método cromatográfico propuesto por Jehl y colaboradores [138]. La concentración de la cefepima encontrada en la muestra de orina fue de  $203.3 \pm 1.9$  ppm por CAdSV, y la encontrada por HPLC fue de  $204.8 \pm 4.6$  ppm.

Se obtuvo un valor de t de -0.53, por lo que se puede comprobar que es menor que el valor crítico, que es de 2.78 ( $P = 0.05$ ), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose un valor de 5.86, siendo inferior al crítico, que es de 39 ( $P = 0.05$ ).

Además se determinó las concentraciones de cefepima en muestras de orina correspondientes a los pacientes 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 descritos en la presente memoria (pág. 212). Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Concentración de la cefepima en muestras de orina correspondientes a distintos pacientes.

Paciente		Cefepima (mg/l)* por CAdSV	Cefepima (mg/l)* por HPLC	t de Student	Contraste F
5		3003 ± 0.9	3000 ± 1.8	2.6	4
6	antes administración	1058 ± 0.8	1060 ± 1.8	1.78	5.06
	posterior administración	1110.9 ± 0.8	1112 ± 0.9	1.59	1.26
7	posterior administración	66.9 ± 0.7	69.2 ± 0.8	1.69	1.3
8	antes administración	250 ± 0.6	250.5 ± 0.14	1.42	18.36
	posterior administración	268 ± 1.2	270.7 ± 2	2.03	2.77
9	antes administración	350.2 ± 0.8	349.2 ± 0.8	1.54	1
	posterior administración	139.3 ± 1	140.4 ± 1.1	1.32	1.21
10	antes administración	700.4 ± 0.9	699.1 ± 1.2	1.45	1.77
	posterior administración	356.8 ± 0.8	355.6 ± 0.7	2.06	1.3
11	antes administración	104.8 ± 0.7	104 ± 0.6	1.53	1.36
	posterior administración	1457 ± 0.5	1459.4 ± 1.9	2.14	14.44
12	antes administración	3590.7 ± 1.6	3587.8 ± 2.1	1.92	1.72
	posterior administración	1195.3 ± 0.6	1193.1 ± 1.8	2	11.11

\* media ± s<sub>n-1</sub> (n=3)

La comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos muestran unos valores de t menores que el valor crítico, que es de 2.78 (P = 0.05), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 (P = 0.05).

#### 4.12.2.-DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Inicialmente se realizó un estudio para establecer la posible influencia del efecto matriz, mediante la comparación de las pendientes de la recta de calibrado en agua con una recta de adición patrón en líquido cefalorraquídeo.

Para preparar la recta de adición patrón en líquido cefalorraquídeo, se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  del mencionado líquido provenientes de un pool humano conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se transfirió a matraces de 25 ml donde se añadieron cantidades adecuadas de cefepima  $10^{-6}\text{ M}$  para obtener concentraciones finales comprendidas entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}\text{ M}$  del fármaco, 5 ml de tampón fosfato a pH 5.8 y agua Milli-Q hasta enrase. Las muestras así preparadas se trasvasaron a una celda electroquímica y las medidas se realizaron en las condiciones anteriormente establecidas. En la Figura 4.13 se representa la recta obtenida a partir de triplicados preparados, como se indicó anteriormente.

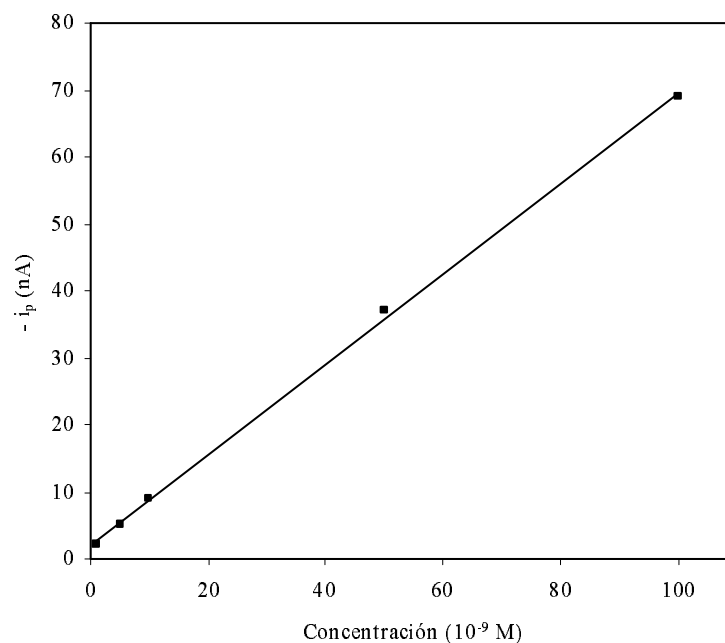


Figura 4.13. Recta de adición patrón en líquido cefalorraquídeo.

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

$$-i_p = (0.645 \pm 0.007)C + (2 \pm 0.44); r = 0.999$$

donde  $i_p$  se expresa en nA y C en  $10^{-9}$  M.

Se realizó un test de comparación de pendientes entre las rectas de calibración externa y en presencia de líquido cefalorraquídeo usando el test de la t de Student, con  $(n_1 + n_2 - 4)$  grados de libertad para un nivel de significación del 5%. Dado que no se encontró diferencia significativa entre las pendientes ( $t_{\text{calculado}} = 0.31$  y  $t_{\text{tabulado}} = 2.31$ ), la cuantificación de la cefepima en muestras de líquido cefalorraquídeo se realizará utilizando la recta de calibración en agua.

En la Figura 4.14 se muestran distintos voltamperogramas de cefepima en líquido cefalorraquídeo, donde se puede observar que el potencial de pico aparece a -1.2 V.

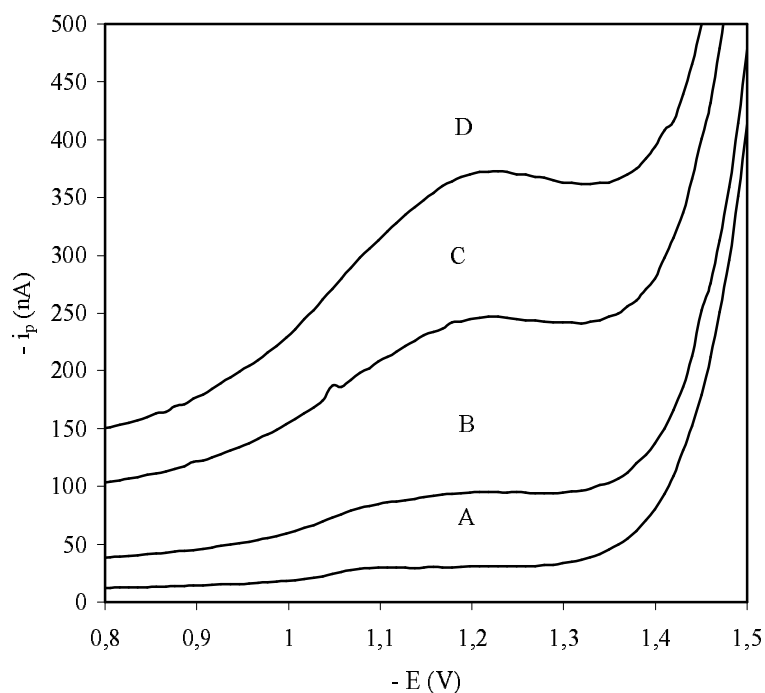


Fig. 4.14. Voltamperogramas de cefepima en líquido cefalorraquídeo: (A) 0 M, (B)  $10^{-8}$  M, (C)  $5 \cdot 10^{-8}$  M, (D)  $10^{-7}$  M.

Posteriormente se procedió a realizar la determinación de cefepima en una muestra de líquido cefalorraquídeo dopado, para lo que se añadió a muestras de líquido cefalorraquídeo cantidades de cefepima para obtener concentraciones  $4.75 \cdot 10^{-9}$  M y  $5 \cdot 10^{-8}$  M y se siguió el procedimiento descrito, realizando tres determinaciones para cada nivel de concentración. Las recuperaciones para las anteriores concentraciones fue de 99.1 % y 98.8 %, con desviaciones estándar de 2.5 y 2.8 %, respectivamente. De todo ello se concluye que el método es bastante sensible para medir concentraciones más bajas que las que habitualmente se presentan después de administrar dosis terapéuticas.



## **CAPÍTULO 5**

---

### **ESTUDIO Y APLICACIONES DE LAS PROPIEDADES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DE CEFEPIMA**

En este capítulo se describen las características espectrofotométricas de la cefepima. Se estudia la influencia del disolvente, de los agentes rédox y del pH. Así mismo, se calcula la constante de disociación de la cefepima por métodos espectrofotométricos y potenciométrico. Además, se propone un método espectrofotométrico que se aplica en la determinación del contenido de cefepima en especialidades farmacéuticas.

### 5.1.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Se registraron los espectros de absorción de la cefepima en agua, metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo y dimetilformamida (Figura 5.1). Para ello se prepararon muestras de cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M en los disolventes anteriormente mencionados, en matraces de 25 ml. En la Figura no aparece el espectro correspondiente al etanol, ya que coincide prácticamente con el del acetonitrilo.

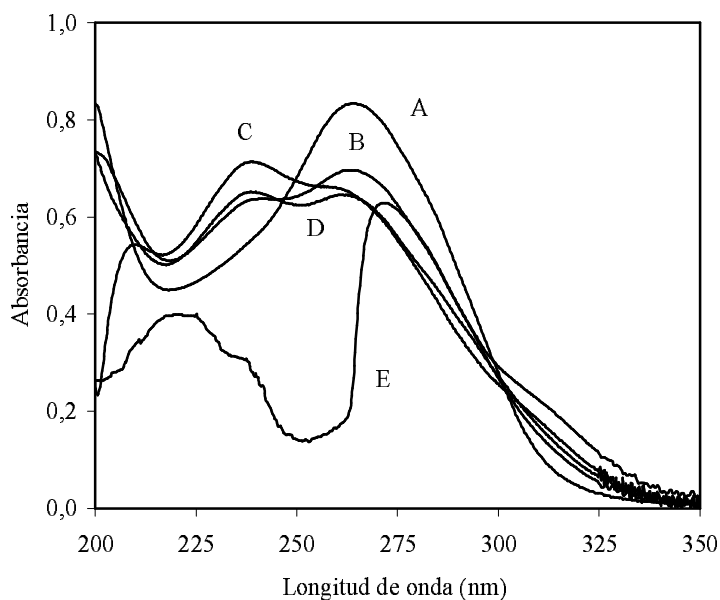


Figura 5.1. Espectros de absorción de  $4 \cdot 10^{-5}$  M de la cefepima en (A) agua, (B) metanol, (C) isopropanol, (D) acetonitrilo y (E) dimetilformamida.

En la Tabla 5.1 aparecen los valores de longitud de onda de máxima absorción, junto con su correspondiente absorbancia. Se observa un desplazamiento batocrómico y una disminución de la absorbancia, al disminuir la polaridad del disolvente.

*Tabla 5.1.* Longitud de onda de máxima absorción y su correspondiente absorbancia para la cefepima en distintos disolventes.

<b>DISOLVENTE</b>	<b><math>\lambda_{\text{abs}}</math></b>	<b>A</b>
Agua	262	0.834
Metanol	263	0.709
Etanol	263	0.651
Isopropanol	263.4	0.664
Acetonitrilo	264	0.646
Dimetilformamida	271.8	0.629

También se estudió la estabilidad de la cefepima en los distintos disolventes a lo largo del tiempo, observándose que en los casos de metanol y etanol existe una inestabilidad con el tiempo, mientras que en el resto de los casos, la cefepima es estable durante al menos cinco horas. En las Figuras 5.2 y 5.3 se representan la estabilidad de la cefepima en los distintos disolventes.

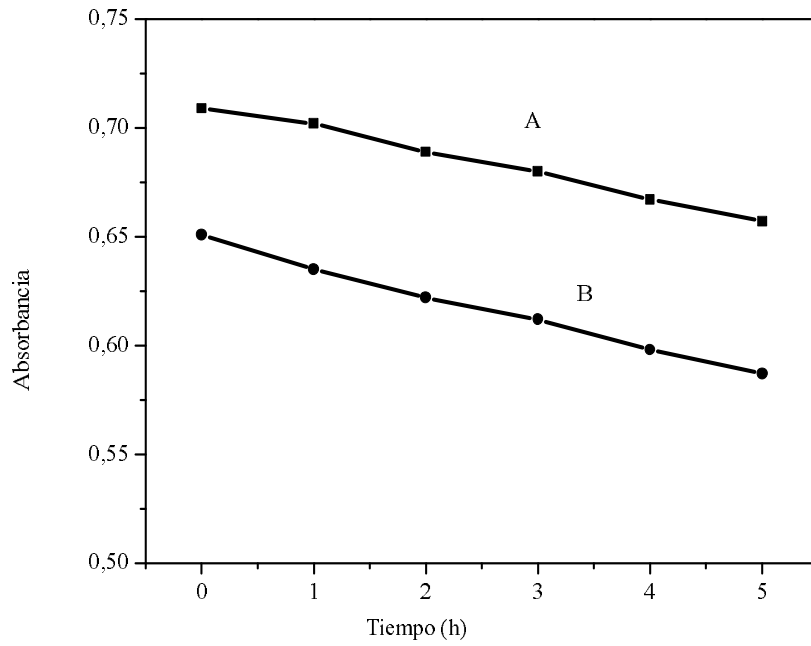


Figura 5.2. Estudio de estabilidad de la cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M en distintos disolventes: (A) metanol, (B) etanol.

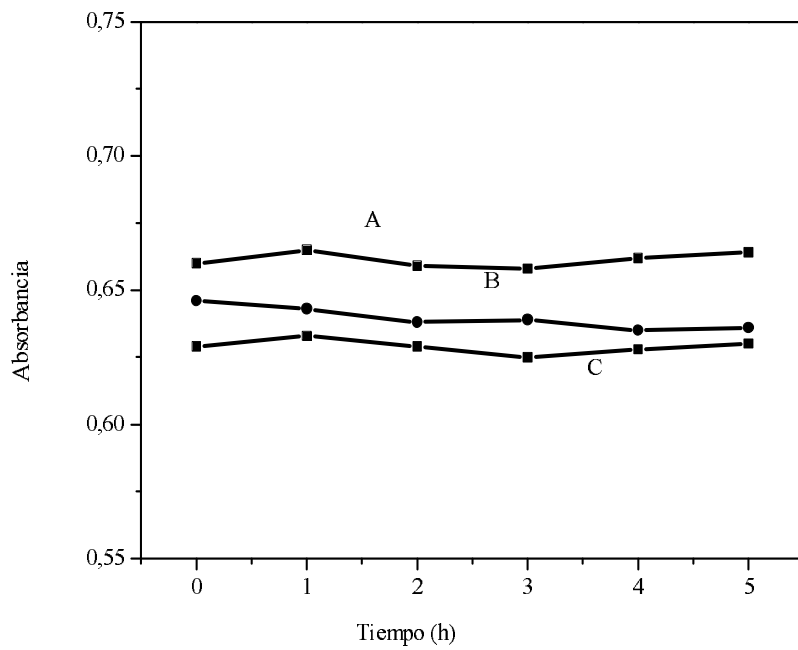


Figura 5.3. Estudio de estabilidad de la cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M en distintos disolventes: (A) isopropanol, (B) acetonitrilo, (C) dimetilformamida.

## 5.2.- COMPORTAMIENTO FRENTE A AGENTES RÉDOX E IONES INORGÁNICOS

La influencia de los agentes rédox se ha estudiado observando la variación con el tiempo del espectro de absorción UV-visible de disoluciones de la cefepima en presencia de tales agentes. Para ello se registraron los espectros de absorción de una serie de disoluciones  $4 \cdot 10^{-5}$  M de cefepima en 25 ml, que contenían 0.1g (o volumen equivalente) de agua oxigenada como oxidante, y ácido ascórbico como reductor.

El agua oxigenada no afecta a la longitud de máxima absorbancia, aunque si se aprecia una disminución en la absorbancia de las bandas del espectro. En el caso del ácido ascórbico, se produce un desplazamiento batocrómico y una disminución de la absorbancia. En la Figura 5.4 se representa los espectros de cefepima en ácido ascórbico a tres valores de pH distintos.

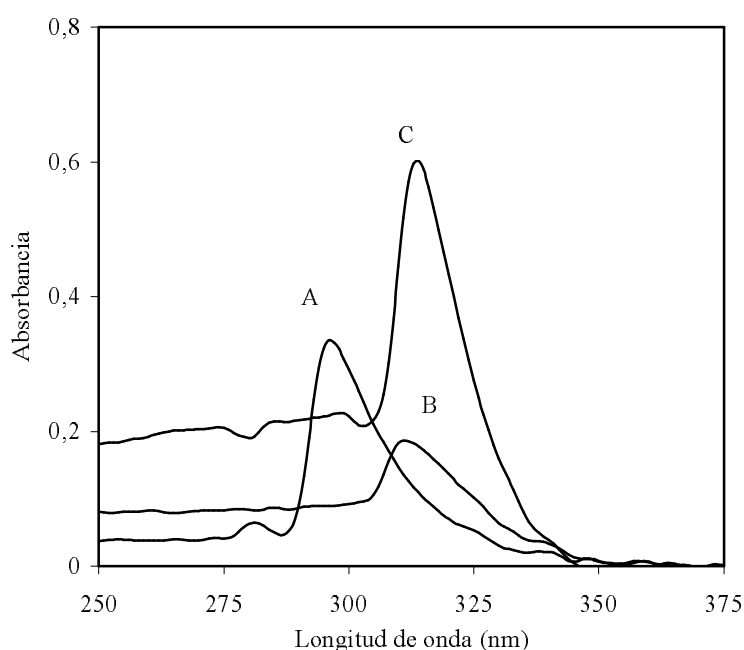


Figura 5.4. Espectros de cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M en ácido ascórbico para distintos valores de pH: (A) 3.0, (B) 6.0, (C) 9.0.

Para el estudio de la influencia de iones inorgánicos, se utilizaron disoluciones de cefepima de concentración  $4 \cdot 10^{-5}$  M. Los iones ensayados fueron Zn(II), Ni(II), Mn(II), Co(II), Ca(II), Mg(II), Al(III), Fe(II), Fe(III) y Cu(II) de concentración 10 ppm, que se mezclaron con la cefepima y tampón fosfato de pH de 3, 6 y 9. En cada caso se comparan las mezclas así obtenidas con blancos preparados de forma análoga, pero sin ión metálico, con objeto de detectar posibles diferencias. Los resultados fueron negativos en todos los casos.

### **5.3.- INFLUENCIA DEL pH SOBRE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN DISOLUCIÓN ACUOSA**

La cefepima presenta un espectro de absorción UV-visible, tanto en medio ácido como en medio básico, que dependen, entre otras variables, del pH. Para estudiar la influencia en medio acuoso del pH en los espectros de absorción molecular UV - visible de la cefepima se ajustaron los valores de pH con  $H_3PO_4$  y NaOH en una serie de disoluciones con una concentración final de cefepima de  $4 \cdot 10^{-5}$  M y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. En la Figura 5.5 aparecen representados los espectros de absorción correspondientes a valores de pH 3, 6 y 9. Como puede observarse, en medio ácido aparece un máximo de absorción a 262 nm, el cual, y a medida que aumenta el pH del medio, se desplaza a 256 nm, y aparece un nuevo máximo a 235 nm.

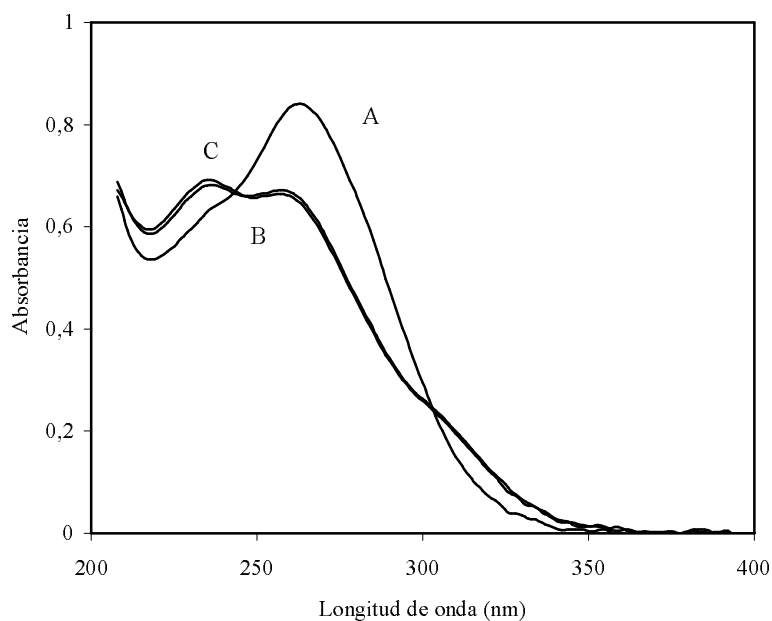


Figura 5.5. Espectros de absorción de la cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M para distintos valores de pH: (A) 3.0, (B) 6.0, (C) 9.0.

También, se realizó un estudio de la estabilidad de la cefepima en función del pH. Como puede observarse en la Figura 5.6 la cefepima es estable, al menos durante 24 horas, a los valores de pH 3, 6 y 9, pero inestable a valores de pH más ácidos y más básicos que éstos.

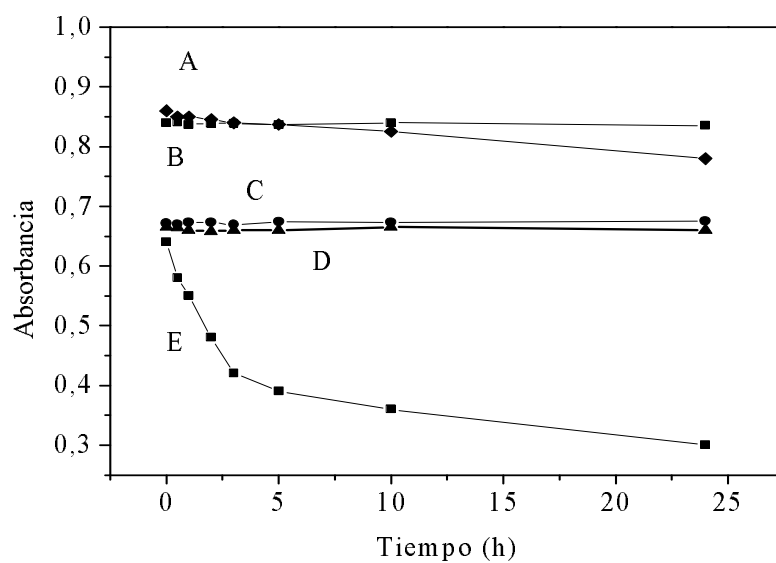


Figura 5.6. Estudio de estabilidad de la cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M para distintos valores de pH: (A) 1, (B) 3, (C) 6, (D) 9, (E) 11.  $\lambda = 262$  nm.

## 5.4.- DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN

### 5.4.1.- DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

Tal y como se indicó anteriormente la cefepima presenta dos máximos a longitudes de ondas de 256 y 235 nm. Por ello, para calcular espectrofotométricamente el pKa de la cefepima, se van a realizar las medidas a estas dos longitudes de ondas.

Se prepararon una serie de muestras con una concentración de cefepima  $4 \cdot 10^{-5}$  M, con valores crecientes de pH (ajustado con NaOH y  $H_3PO_4$ ), 5 ml de disolución de KCl 1 M (cuya misión es mantener un valor de fuerza iónica de 0.2 en todas las muestras) y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, midiéndose las absorbancias a 256 y 235 nm frente a un blanco. En la Figura 5.7 aparecen recogidos los valores de absorbancia a 256 nm frente a los correspondientes de pH.

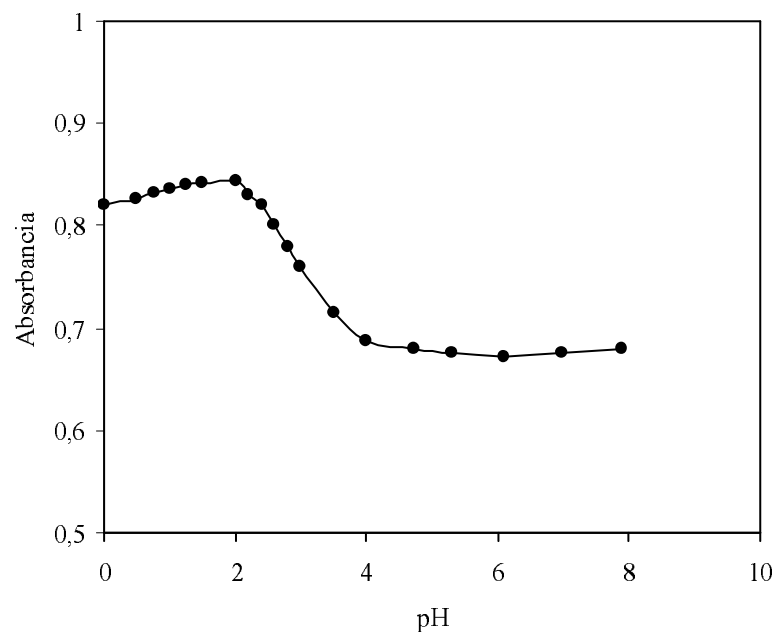


Figura 5.7. Influencia del pH en la absorbancia de la cefepima.  $\lambda = 256$  nm.



Aplicando el método de Albert y Sergeant [165], el cálculo del pKa se obtendrá como la media de los valores individuales de pKa en el rango de pH comprendido entre 2.2 y 4, según la ecuación:

$$K_a = [H^+] \frac{A_{HR} - A}{A - A_R}$$

donde  $A_{HR}$  es 0.844 y  $A_R$  es 0.680. En la Tabla 5.2 se recoge los valores de pKa para cada punto de valor de pH en el rango indicado.

Tabla 5.2. Valores de pKa individuales correspondientes a cada valor de pH.

pH	pKa
2.2	3.22
2.4	3.16
2.6	3.03
2.8	2.99
3	2.96
3.5	2.92
4	2.68

de esta forma se obtiene un valor medio de pKa de  $2.99 \pm 0.16$ .

Aplicando el método de Stenström y Goldsmith [166], donde se obtiene gráficamente un valor de pKa correspondiente al valor de  $pH_{1/2}$ , según:

$$A = \frac{1}{2} (A_{HR} + A_R)$$

se obtiene un valor de  $A$  de 0.762, y llevando este valor a la curva de absorbancia-pH a 256 nm, corresponde un valor de  $\text{pH}_{1/2}$  de 2.98 que coincide con el valor del  $\text{pK}_a$  de la cefepima.

La curva Absorbancia-pH a 235 nm se muestra en la Figura 5.8. Se observa un primer salto entre pH 0 y 2 y otro entre pH 2 y 5, pero el primero se encuentra en una zona de inestabilidad, tal y como se manifestó anteriormente.

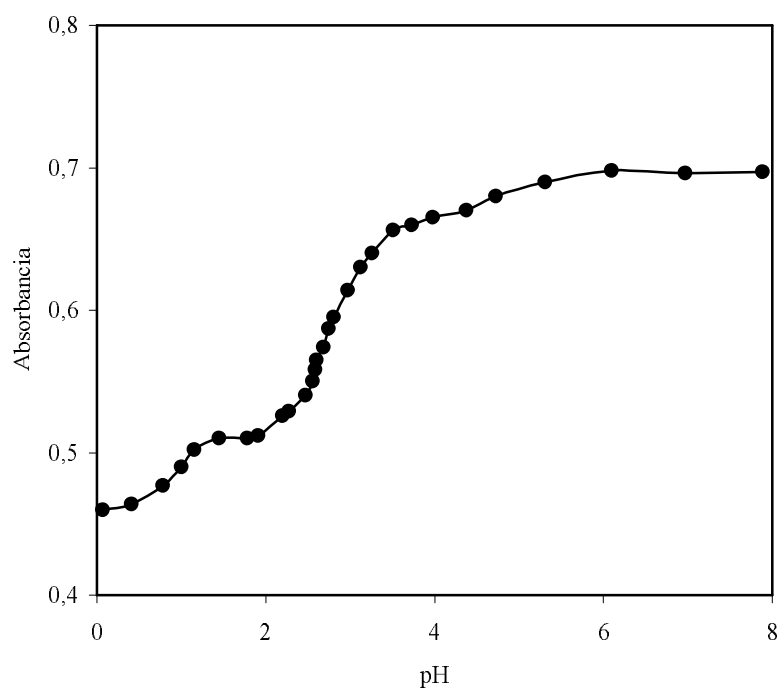


Figura 5.8.

Influencia del pH en la absorbancia de la cefepima.  $\lambda = 235$  nm.

Para comprobar si el primer salto observado es debido a una inestabilidad, se calcula el número de protones intercambiados, tal como indica Buddessinsky [167], entre dos porciones constantes de absorbancia ( $A_{HR}$  y  $A_R$ ) y que viene dado por:

$$n_H = \frac{(dA/dpH)_{A \rightarrow (A_R - A_{HR})/2}}{0.575(A_R - A_{HR})}$$

Si tomamos los puntos entre pH 0 y 2 encontramos que el valor de la pendiente ( $dA/dpH$ ) posee un valor de 0.059. Tomando  $A_R = 0.51$  y  $A_{HR} = 0.46$ , obtenemos un valor de  $n_H$  de 2, alejado del valor esperable de 1. Probando en el tramo siguiente, entre pH 2 y 5, ( $dA/dpH$ ) es 0.09. Tomando como  $A_R = 0.7$  y  $A_{HR} = 0.51$ , obtenemos un valor de  $n_H$  de 0.83, muy próximo a 1, que es el resultado esperable. Por lo tanto tomaremos los valores entre pH 2 y 5 para evaluar el pKa. Los valores exactos de las absorbancias límite  $A_R$  y  $A_{HR}$  no los conocemos, por lo que utilizaremos un método iterativo de Ramette [168] para calcular la constante de ionización. Partimos de la expresión fundamental del cálculo de la constante de acidez de un ácido monoprótico a partir de los datos A-pH:

$$K_a = [H^+] \frac{A_{HR} - A}{A - A_R}$$

que podemos reescribir como:

$$A = A_R + \frac{[H^+]}{K_a} (A_{HR} - A)$$

Si se representa A frente a  $[H^+](A_{HR} - A)$  se obtiene una recta de pendiente  $1/K_a$ . Al no conocer con exactitud el valor de  $A_{HR}$  se le dará valores, para calcular los parámetros de la recta y comprobar su linealidad a partir del coeficiente de correlación. En la Tabla 5.3 se recoge los valores de  $A_{HR}$  y sus correspondientes coeficientes de correlación.

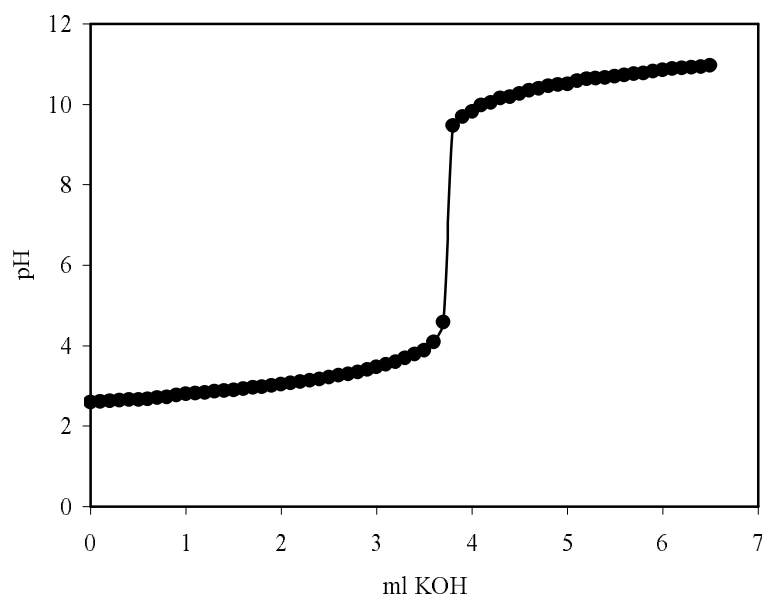
Tabla 5.3. Valores de  $A_{HR}$  y coeficientes de correlación.

$A_{HR}$	$R$
0.51	0.63
0.49	0.96
0.48	0.96
0.47	0.965
0.46	0.964
0.45	0.961
0.43	0.95

Tomando  $A_{HR}$  como 0.47, se obtiene una recta con una ordenada  $A_R$  de 0.681 y una pendiente  $1/K_a$  de 488.04, con lo que se obtiene un valor de  $pK_a$  de 2.7.

#### 5.4.2.- DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA

También se calcula la constante de ionización por valoración potenciométrica. Para ello se prepara una muestra de 100 ml con una concentración  $2 \cdot 10^{-3}$  M en cefepima y se valora con KOH 0.0981M, utilizando un electrodo de vidrio previamente calibrado. En la Figura 5.9 se representa la curva de la valoración potenciométrica.

Figura 5.9. Curva de la valoración potenciométrica de la cefepima  $2 \cdot 10^{-3}$  M.

A partir de los datos pH-V se calculan los valores de la primera y segunda derivada en el rango de pH de 3.5 a 10, que es donde se produce el salto. En la Figura 5.10 se representa la segunda derivada, donde se observa que el valor que correspondería a  $\Delta^2 pH / \Delta v^2 = 0$  puede calcularse fácilmente por interpolación lineal, dando un volumen de equivalencia de 3.75 ml.

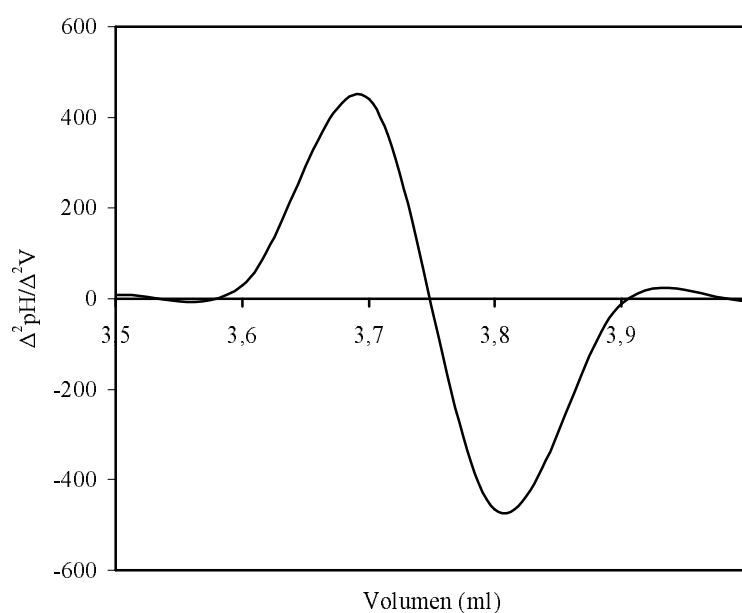


Figura 5.10. Representación de la segunda derivada.

El punto de semineutralización, que corresponde a un  $\text{pH} = \text{pKa}$  correspondería a la adición de un volumen de 1.86 ml. Si interpolamos linealmente en los valores originales de datos pH-V, obtenemos que  $\text{pKa} = 3$ .

Para llevar a cabo el cálculo de una manera más rigurosa se ha utilizado el programa EUTIT [169], que se basa en la curva pH-V y que la linealiza de una forma semejante al método de Gran [170] pero teniendo en cuenta los errores cometidos en las variables que se toman como abscisa y ordenada. Admitiendo que el error en la lectura del volumen era de  $\pm 0.05$  y en el pH de  $\pm 0.02$ , el valor de pKa obtenido resultó ser de  $2.65 \pm 0.02$  tomando 30 puntos dentro de la zona ácida anterior al volumen de equivalencia.

En la Tabla 5.4, se recoge los valores de pKa obtenidos mediante la determinación espectrofotométrica y potenciométrica.

Tabla 5.4. Comparación de los valores de pKa para la cefepima.

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA			DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA
$\lambda = 256 \text{ nm}$		$\lambda = 235 \text{ nm}$	
Albert y Serjeant	Stenström y Goldsmith	Ramette	Primera y segunda derivada EUTIT
2.99	2.98	2.7	2.65

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores [153,155] en la determinación, tanto espectrofotométrica como potenciométrica, del pKa de la cefepima.

### 5.5. – RECTA DE CALIBRADO

Se preparan por quintuplicado, disoluciones de cefepima con concentraciones crecientes en el rango de 1 - 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  que contienen 5 ml de tampón fosfato de pH 2 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Se elige este pH ya que la absorbancia es máxima y corresponde exclusivamente a la forma ácida de la cefepima. Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 262 nm. Se representa en la Figura 5.11 la recta de calibrado obtenida a partir de las muestras preparadas como anteriormente se indicó.

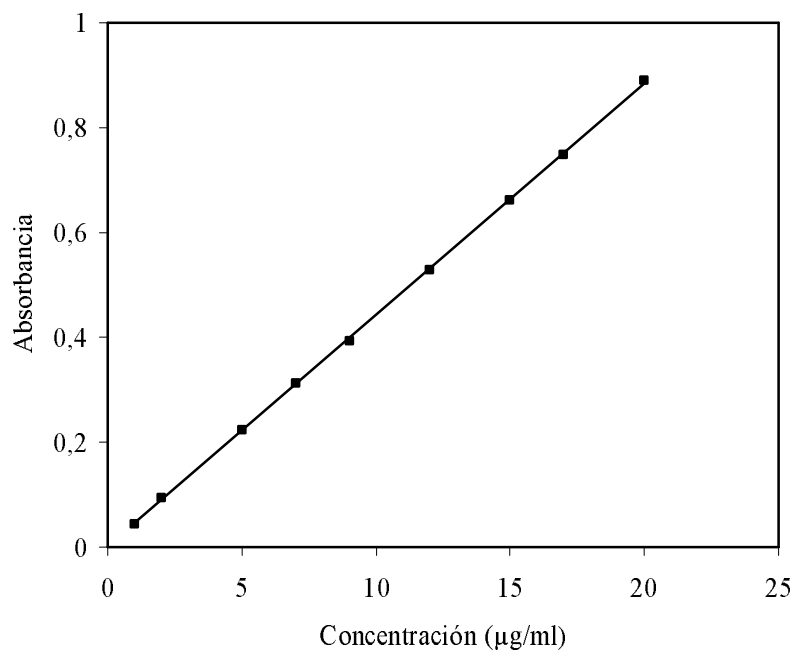


Figura 5.11. Recta de Calibrado para la cefepima.

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

$$A = (4.37 \pm 0.01) 10^{-2} C + (0.5 \pm 0.1) 10^{-2}; r=0.9998$$

## 5.6. – REPETITIVIDAD

Para conocer la repetitividad intradía del método propuesto se prepararon 10 muestras iguales, conteniendo 8 µg/ml de cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 2 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml, y midiendo la absorbancia a 262 nm. Los parámetros estadísticos calculados mostraron un valor medio de la señal ( $y_m$ ) de 0.357, una desviación estándar (s) de  $10^{-3}$  y una desviación estándar relativa (%E) de 0.277.

Para conocer la repetitividad interdía del método propuesto se preparó y midió una muestra cada día, durante 10 días, conteniendo 8  $\mu\text{g/ml}$  de la cefepima, 5 ml de tampón fosfato de pH 2 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Los parámetros fueron calculados de acuerdo a las expresiones anteriormente mencionadas, obteniéndose un valor medio de la señal ( $y_m$ ) de 0.357, una desviación estándar (s) de  $1.8 \cdot 10^{-3}$  y una desviación estándar relativa (%E) de 0.537.

### **5.7.- LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

Se calculó el límite de detección y de cuantificación, tal y como se describe en el capítulo 2, resultando un valor de 0.31mg/l y de 1.04 mg/l, respectivamente.

### **5.8.- PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CEFEPIMA**

Una vez optimizadas las variables que influyen en las características espectrofotométricas de la cefepima, se propone un nuevo método espectrofotométrico basado en la medida de la absorbancia a 262 nm para la determinación de este principio activo. Se toma una cantidad determinada de disolución patrón de cefepima para que la concentración final se encuentre en el rango 1 - 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , junto con 5 ml de tampón fosfato pH 2 y agua Milli-Q hasta completar un volumen de 25 ml. Se mide la absorbancia a 262 nm en una cubeta de cuarzo frente a un blanco preparado en las mismas condiciones, sin la cefepima. Por comparación con la correspondiente recta de calibrado obtenida en iguales condiciones, se determina la concentración de la cefepima.



### 5.9.-DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CEFEPIMA EN ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS

El método propuesto fue aplicado a la determinación del contenido de cefepima en tres especialidades farmacéuticas de Maxipime<sup>®</sup> 2g, 1g y 500 mg. Para ello, se disuelve el contenido del vial del fármaco en agua Milli-Q y se determina el contenido en cefepima aplicando el procedimiento propuesto. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 5.5.

*Tabla 5.5.* Resultados de la determinación de la cefepima en tres especialidades farmacéuticas.

Especialidad farmacéutica	Contenido nominal (mg)	Espectrofotometría* (mg)	HPLC* (mg)	t de Student	Contraste F
Maxipime 0.5	495	496 ± 2	494 ± 1	1.44	4
Maxipime 1.0	951	953 ± 6	954 ± 3	0.26	4
Maxipime 2.0	952	955 ± 5	956 ± 3	0.29	2.77

\*media ± desviación estándar (n=5)

Los resultados obtenidos por espectrofotometría se compararon con los obtenidos por el método cromatográfico propuesto por Jehl y colaboradores [138]. Tal y como se puede comprobar los valores de t son menores que el valor crítico, que es de 2.78 (P = 0.05), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y el de HPLC. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 (P= 0.05).

## **CAPÍTULO 6**

---

### **DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA**

En este capítulo se estudian las condiciones necesarias para llevar a cabo la determinación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de cefepima en suero, líquido cefalorraquídeo y orina de pacientes tratados con este fármaco.

Después de realizar una revisión bibliográfica [136-152] no se encontró ningún método cromatográfico aplicado a la determinación de cefepima en muestras de líquido cefalorraquídeo, donde los niveles de fármaco son bajos.

Se desarrolló un método cromatográfico, usando una fase móvil que proporciona una sensibilidad suficiente para determinar niveles bajos de cefepima en muestras de fluidos biológicos.

## **6.1.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS**

Se estudian diferentes variables, con el fin de optimizar el método, tales como, la influencia del pH, proporción de los componentes de la fase móvil, concentración del tampón en la fase móvil y velocidad del flujo.

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la composición de las fases móviles utilizadas para otras cefalosporinas [124-133], en las que se usaban distintos disolventes orgánicos, como acetonitrilo, metanol y dioxano disueltos en distintos tampones. Después de ensayarlos con la cefepima, incluso en distintas mezclas, la fase móvil que mejores resultados proporcionaba era la compuesta por metanol y tampón fosfato.

### **6.1.1.- OPTIMIZACIÓN DEL pH EN LA FASE MÓVIL**

Para realizar este estudio, se prepararon disoluciones de tampón fosfato 50mM a tres valores distintos de pH comprendidos entre 3 y 8.4, usando una fase móvil cuya composición es metanol:tampón fosfato (25:75) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. En estas condiciones, se inyectaron soluciones de cefepima 10 µg/ml en el sistema cromatográfico. En la Tabla 6.1 se representan los resultados correspondientes a los tiempos de retención obtenidos para los distintos valores de pH probados.

*Tabla 6.1.* Influencia del pH de la fase móvil en la retención de cefepima.

pH tampón fosfato	t <sub>R</sub>
3	4.8
4.5	3.1
7	2.9
8.4	2.68

Se puede observar que a medida que aumenta el pH de la fase móvil disminuye el tiempo de retención, por lo que se decide tomar como pH óptimo 7.

### **6.1.2.- SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA**

Tal y como se estudió en el capítulo 5, la cefepima presenta dos máximos a longitudes de onda de 235 y 256 nm, a un pH de 7. Se elige la longitud de onda de 256 nm para el estudio cromatográfico, con el objeto de evitar posibles interferencias de otros compuestos, en la aplicación a fluidos biológicos. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

### **6.1.3.- OPTIMIZACIÓN DE LA PROPORCIÓN ENTRE FASE ORGÁNICA Y FASE ACUOSA EN LA FASE MÓVIL**

Para realizar este estudio, se prepararon fases móviles con distintas proporción entre fase orgánica (metanol) y fase acuosa (tampón fosfato 50 mM) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. En estas condiciones, se inyectaron soluciones de cefepima 10 µg/ml en el sistema cromatográfico. En la Tabla 6.2 se representan los resultados correspondientes a los tiempos de retención obtenidos para las distintas fases móviles ensayadas.

*Tabla 6.2.* Influencia de la proporción entre fase orgánica y fase acuosa de la fase móvil.

<b>Fase orgánica:fase acuosa</b>	<b>t<sub>R</sub></b>
90:10	no resuelto
50:50	2.11
25:75	2.95
10:90	5.36

Como puede observarse, un aumento en la proporción de fase acuosa produce un aumento en el tiempo de retención, por lo que se decide tomar como proporción óptima 25:75.

#### **6.1.4.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN**

Se estudió la concentración del tampón de la fase móvil en el rango comprendido entre 10 y 100 mM, utilizando disoluciones de cefepima 10 µg/ml y a un flujo de 1 ml/min. En la Tabla 6.3 se representan los resultados correspondientes a los tiempos factores de retención obtenidos para las distintas concentraciones probadas.

*Tabla 6.3.* Influencia de la concentración del tampón de la fase móvil en tiempo de retención de cefepima.

<b>Concentración tampón Fosfato (mM)</b>	<b>t<sub>R</sub></b>
10	2.8
25	2.83
50	2.95
75	2.8
100	3.04

Se decide elegir 10 mM como concentración del tampón óptima ya que proporciona buenos resultados y es capaz de mantener el pH de la fase móvil con el tiempo.

### 6.1.5.- ESTUDIO DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL

Con objeto de elegir el flujo de la fase móvil más apropiado para la determinación de la cefepima (en distintos fluidos biológicos), se ha estudiado como influye éste en la eficacia del sistema cromatográfico. Para ello, se prepararon disoluciones que contenían cefepima 10 µg/ml y se inyectaron en el sistema, variando el flujo entre 0.5 y 1.25 ml/min.

En la Figura 6.1 se representa el número de platos teóricos en los diferentes flujos ensayados.

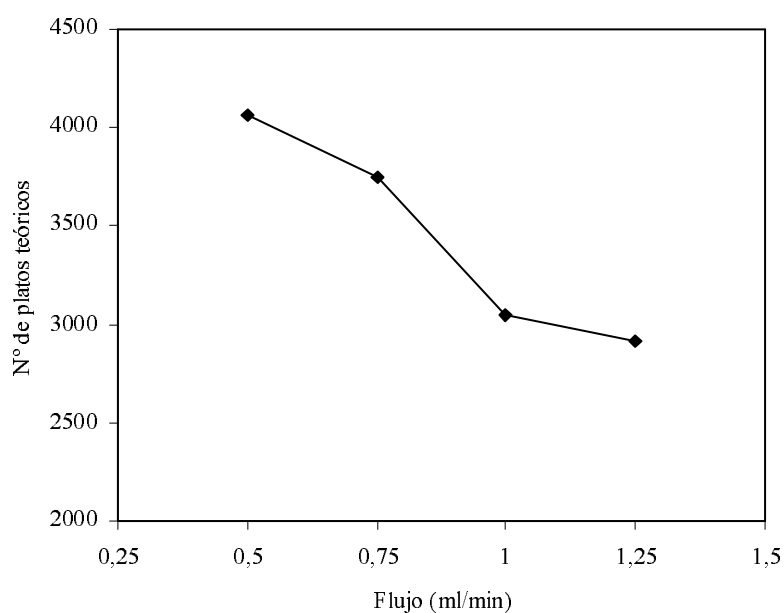


Figura 6.1. Número de platos teóricos para cada uno de los flujos ensayados.

Como se observa, en el rango de 1 a 1.25 ml/min no existe una variación sustancial en el número de platos teóricos; sin embargo para un flujo de 0.5 ml/min, este parámetro es elevado. Por otro lado, al aumentar el flujo de la fase móvil disminuye el área del pico y el tiempo de retención [171], como puede comprobarse en la Tabla 6.4. Este hecho permite elegir un flujo de la fase móvil más adecuado en función de las situaciones de compromiso entre la sensibilidad y el tiempo de retención para cada fluido biológico. Así, en muestras de líquido cefalorraquídeo donde se encuentran niveles bajos de cefepima, se elige un flujo de 0.5 ml/min donde la sensibilidad es alta aunque el tiempo de retención sea elevado. Por el contrario, para muestras de suero y orina donde los niveles de cefepima son más altos, se

elige un flujo de 1 ml/min donde el tiempo de retención es menor aunque la sensibilidad sea más baja, pero suficiente para este tipo de muestras.

*Tabla 6.4.* Influencia del flujo de la fase móvil en el área de pico y el tiempo de retención en cefepima 10 mg/l.

<b>Flujo</b>	<b>Área de pico</b>	<b>t<sub>R</sub></b>
0.5	392746	5.57
0.75	266673	3.76
1	203232	2.8
1.25	166903	2.4

## **6.2.- PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO**

Con el objeto de validar el método cromatográfico, se siguieron las recomendaciones propuestas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) sobre la validación de métodos por cromatografía líquida de alta eficacia para el análisis de productos farmacéuticos [172].

Uno de los muchos factores críticos en el desarrollo de principios activos es asegurar que los métodos analíticos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) usados para el análisis de estas sustancias proporcionen datos significativos. Tanto la Administración Americana de Productos Alimentarios y Farmacéuticos (FDA) como la Farmacopea Americana (USP), reconocen la importancia de este criterio, por lo que han desarrollado por separado en los últimos años, diversos requerimientos para los procesos de validación, a través de distintas directrices [173-175].

La Conferencia Internacional de Armonización (ICH) ha combinado los requerimientos de validación de las citadas asociaciones, y ha incluido algunos nuevos,

con el objetivo de aclarar y reunir todos aquellos requerimientos necesarios para validar un método analítico por HPLC para la determinación de los principios activos.

Los métodos de validación proporcionan la seguridad de que un método analítico es exacto, específico, reproducible y robusto en el rango en el que el analito es analizado. Es un proceso que proporciona una evidencia de que el método es lo que se intentaba hacer. En la validación se seleccionan los parámetros necesarios y se aceptan criterios para un determinado método.

El primer paso en el desarrollo de un protocolo de un método de validación es determinar el objetivo del propio método, es decir, para qué se va a usar el método, o qué intenta demostrar. De esta forma el protocolo del método de validación será distinto si se intenta monitorizar a un paciente, determinar la potencia del principio activo, el nivel de impurezas, o se intenta una evaluación cualitativa para identificación. Además, y en todos los casos, hay que tener en cuenta el tipo de muestra donde va a ser aplicado el método y las interferencias que caben esperarse. También hay que tener en cuenta la exactitud, precisión, sensibilidad y límite de detección requerido. Una vez resueltas estas cuestiones y realizada una evaluación preliminar, se determina la mejor forma de alcanzar los objetivos del método de validación.

La preparación y ejecución de un método de validación puede seguir un procedimiento de operación estándar mediante distintos pasos:

1. Reunir un grupo de funciones y asignar responsabilidades individuales.
2. Definir el propósito y ámbito del método.
3. Determinar el enfoque de la validación, el tipo de método y las características analíticas correspondientes.
4. Preparar un procedimiento de operación estándar de validación.
5. Fijar el criterio de aceptación en base a la evolución del método.
6. Escribir el método de forma provisional.
7. Desarrollar experimentos de prevalidación.
8. Ajustar los parámetros del método y/o aceptar los criterios si es necesario.
9. Aprobar el procedimiento de operación estándar para la validación.



10. Ejecutar el procedimiento de operación estándar para la validación.
11. Preparar el informe de validación y aprobarlo.
12. Archivar el procedimiento de operación estándar para la validación y el informe.

A continuación, se relacionan en la Tabla 6.5 los parámetros usados por la ICH, USP y FDA para la validación de un método.

*Tabla 6.5. Parámetros de validación según ICH, USP y FDA*

<b>ICH/USP</b>	<b>FDA</b>
Especificidad	Especificidad
Exactitud	Exactitud
Precisión (repetitividad y reproducibilidad)	Sensibilidad
Límite de detección y cuantificación	Reproducibilidad
Linealidad	Recuperaciones
Rango	Robustez
Robustez	Estabilidad de soluciones
	Test de aptitud del sistema

Tanto la USP como la ICH reconocen que no son necesarios evaluar todos los parámetros, ya que indican que, dependiendo del tipo de método y de su uso, se necesita investigar unos u otros parámetros. En la Tabla 6.6 se recoge esta selección de parámetros.

Tabla 6.6. Características requeridas para un procedimiento de validación.

Parámetros analíticos	USP (Categorías)					ICH			
	1	2		3	4	Identificación	test de impureza		Método
		Cuantitativo	Test límite				Cuantitativo	Test límite	
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No	No	Sí	No	Sí
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No	No	Sí	No	Sí
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	Sí	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No	No	Sí	No	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No	No	Sí	No	Sí
Rango	Sí	Sí	*	*	No	No	Sí	No	Sí

\* Parámetros que pueden ser requeridos dependiendo de la naturaleza del test específico

La USP divide los métodos analíticos en cuatro categorías:

- a) Categoría 1 o método para la cuantificación del componente mayoritario o para la actividad de los componentes. Se propone no evaluar los límites de detección y cuantificación ya que normalmente estos componentes se presentan en niveles altos.
- b) Categoría 2 o determinación de impurezas o degradación de productos, que está subdividida en 2 subcategorías: cuantitativo y test límite. Si la información cuantitativa es deseada no es necesario determinar el límite de detección, aunque sí es necesario el límite de cuantificación. El caso contrario ocurre cuando se va a realizar un test límite.
- c) Categoría 3 o determinación de las características de preparación, como por ejemplo test de disolución o de liberación del principio activo.
- d) Categoría 4 o de test de identificación.

Como puede observarse, la ICH recoge los métodos en tres categorías: método (similar a categoría 1 de USP), test de impureza (similar a categoría 2 de USP), e identificación. La ICH no recoge una categoría semejante a la 3 de USP.

### **6.2.1.- PREVALIDACIÓN**

Un paso previo a la validación de un método consiste en evaluar aquellos factores que pueden influir decisivamente en el método, como son:

#### **6.2.1.1.- Cualificación del equipamiento analítico**

Este paso consiste en diseñar, mantener, calibrar y comprobar adecuadamente el sistema analítico. Comienza con la fabricación del equipo donde tanto el instrumento analítico como el software debe ser desarrollado, diseñado y producido de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio, con la Organización Internacional de Estandarización (ISO) u otros. Posteriormente se realiza una cualificación de la instalación, donde se establece que el equipo ha sido instalado adecuadamente; una cualificación operacional, donde se asegura que los módulos del sistema operan de acuerdo con especificaciones de exactitud, linealidad y precisión, mediante diagnósticos de rutina o test de verificación, como por ejemplo exactitud del detector, flujo o precisión del inyector; y una cualificación de la verificación, donde se comprueba el correcto funcionamiento del equipo usando una mezcla de analitos perfectamente caracterizados. Posteriormente, y a lo largo del período de uso, el equipo debe ser calibrado, mantenido y estandarizado de acuerdo a los procedimientos de mantenimiento suministrado por el fabricante.

En nuestro caso, el sistema cromatográfico empleado ha sido testado y validado por el Departamento de Aseguramiento de Calidad de Instrumentación, de acuerdo con las últimas reglas de calidad y garantía. De igual forma la instalación ha sido realizada por personal acreditado. El software usado en el equipo posee la certificación ISO 9001.

### 6.2.1.2.- Estabilidad de las soluciones

Para obtener resultados reproducibles y seguros se debe determinar la estabilidad de las soluciones, reactivos y fase móvil antes de validar el método. Dependiendo de las necesidades se puede comprobar la estabilidad de las soluciones a lo largo de 24 horas por comparación cuantitativa con respecto a soluciones preparadas recientemente en unas condiciones definidas de almacenamiento. Se acepta como criterio de estabilidad un cambio menor o igual a un 2% de las soluciones estándar. En el caso de fases móviles se acepta cambios menores o iguales al 2% en el factor de capacidad y en la resolución con respecto a fase móvil preparada recientemente. En el caso de análisis de impurezas, las muestras, las soluciones estándar y la fase móvil deben ser estables durante 24 horas bajo condiciones definidas de almacenamiento. En este caso se aceptan variaciones inferiores al 20% al nivel del límite de cuantificación del procedimiento con respecto a muestras y fase móvil recién preparadas.

En nuestro caso se comprobó que las disoluciones acuosas de cefepima de 1000 mg/l, almacenadas en la oscuridad a 4°C, son estables al menos 2 semanas. Las disoluciones acuosas de trabajo de cefepima son estables durante al menos 24 horas, y la fase móvil al menos durante 48 horas.

### 6.2.1.3.- Test de aptitud del sistema

Antes de desarrollar la validación se ha de establecer que el sistema y el procedimiento sean capaces de proporcionar datos de calidad aceptable. Este test se basa en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras constituyen un sistema considerado como un todo.

El test de aptitud del sistema (*system suitability test*) permite comprobar si la resolución y la repetitividad del sistema es adecuada para los análisis que se van a realizar.

Se obtuvieron para la cefepima unos valores de 0.9 y 1.7 para los factores de capacidad a los flujos de 1 ml/min y 0.5 ml/min, respectivamente.

Tal y como se representó en la Figura 6.1, donde se muestra la influencia del flujo de la fase móvil sobre el número de platos teóricos, se comprueba que en todos los casos el número de platos teóricos es mayor de 2000.

Se calculó la Resolución ( $R_s$ ) del pico de cefepima respecto a otros picos cromatográficos obtenidos en cada tipo de matriz ensayada; así se obtuvieron valores de  $R_s$  de 2.003, 2.312 y de 2.052 para suero, orina y líquido cefalorraquídeo, respectivamente. Resoluciones iguales o mayores de 1.5-2.0 se aceptan como óptimas.

Para 6 replicas de una disolución de cefepima de 10 mg/l inyectadas en un mismo día, se obtuvo una desviación estándar en el área de pico del 0.95% y de 0.63% en el tiempo de retención, para un flujo de 1ml/min. Para un flujo de 0.5 ml/min se obtuvieron desviaciones de 0.93% y 0.26% para el área de pico y el tiempo de retención, respectivamente.

Los valores calculados para la asimetría del pico de cefepima con flujos de 1 ml/min y 0.5 ml/min fueron de 1.31 y 1.27, respectivamente.

Se obtuvo un valor de 5.2 para la relación señal-ruido a un flujo de 1ml/min, y para un flujo de 0.5 ml/min el valor obtenido fue 3.7.

La pureza óptica del pico de cefepima para distintas concentraciones en las diferentes matrices osciló entre 97.2 y 99.98%, lo que indica una excelente separación de la cefepima respecto a posibles interferencias de las matrices ensayadas.

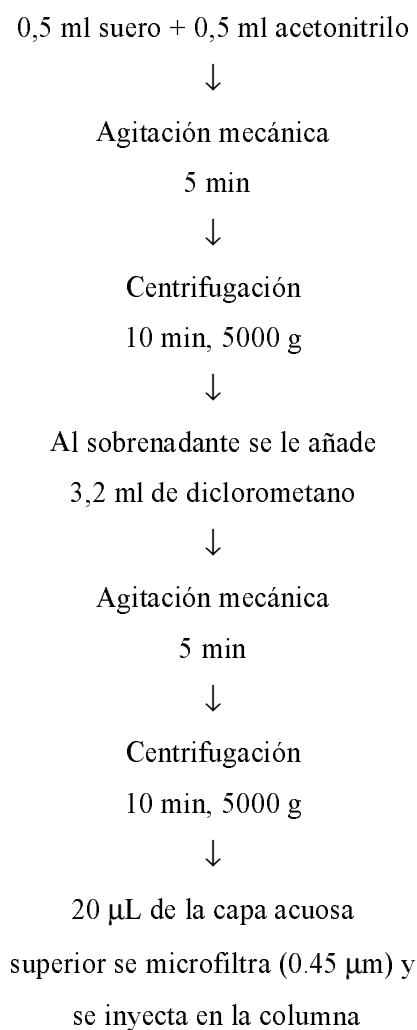
Los parámetros obtenidos indican una buena adecuación del sistema para el desarrollo de un posible procedimiento de cefepima en suero, orina y líquido cefalorraquídeo.

### **6.2.2.- VALIDACIÓN**

A continuación se indican los distintos parámetros utilizados para llevar a cabo la validación del método cromatográfico que se propone.

### 6.2.2.1.- Exactitud

De acuerdo con las recomendaciones de la ICH se realizaron nueve determinaciones correspondientes al análisis por triplicado de muestras dopadas a tres niveles de concentración (10, 50 y 150 mg/l) en suero, orina y líquido cefalorraquídeo. Tras realizar una revisión bibliográfica sobre los métodos de extracción de la cefepima en suero [136-138, 140, 142, 144-145, 148], se decidió tratar las muestras como se indica en el Esquema 6.1, que es una adaptación del método propuesto por Elkhaili, H. [138] y que proporciona los mejores resultados. Las muestras, una vez extraídas, son microfiltradas antes de ser inyectadas en la columna. Las muestras de orina y líquido cefalorraquídeo no necesitaron tratamiento previo a ser inyectadas, a excepción de la microfiltración. En la Tabla 6.7 se recogen los resultados obtenidos, donde se observa que la recuperación media está comprendida entre el 98.5 y el 102%, lo que de acuerdo con las directrices de la FDA (variaciones inferiores al 2%), indica una exactitud adecuada.



*Esquema 6.1.* Proceso de extracción de la cefepima en muestras de suero.

*Tabla 6.7.* Porcentaje de recuperación de la cefepima en suero, orina y líquido cefalorraquídeo.

Nivel (µg/ml)	Matriz		
	Suero <sup>a</sup>	Orina <sup>a</sup>	LCR <sup>a</sup>
10	98.5±0.2	100.1±0.2	99.1±0.6
50	101.9±0.3	98.9±0.5	99.8±0.3
150	99.6±0.7	101.2±0.2	--- <sup>b</sup>

<sup>a</sup> media ± s<sub>n-1</sub> (n=3)

<sup>b</sup> fuera del rango lineal

### 6.2.2.2.- Precisión

El estudio de la precisión se llevó a cabo midiendo 10 muestras de cefepima de 10 mg/l en los distintos fluidos biológicos. Los resultados de las desviaciones estándar relativas fueron de 1.3, 1.2 y 0.9 % para suero, orina y líquido cefalorraquídeo, respectivamente. El estudio para un periodo de 10 días, mostró desviaciones estándar relativas de 1.4, 1.3 y 1.1 %, respectivamente.

### 6.2.2.3.- Linealidad

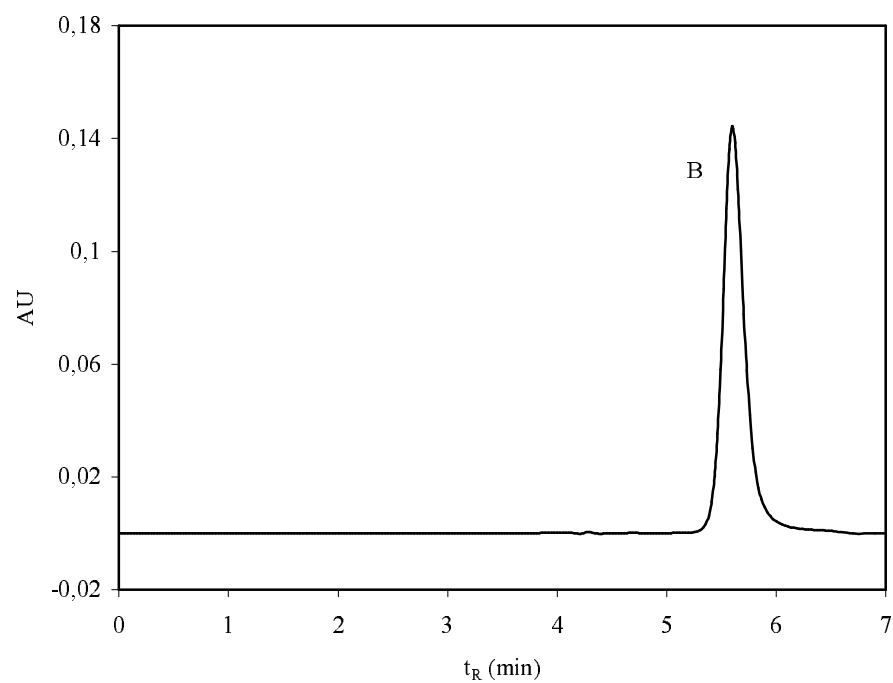
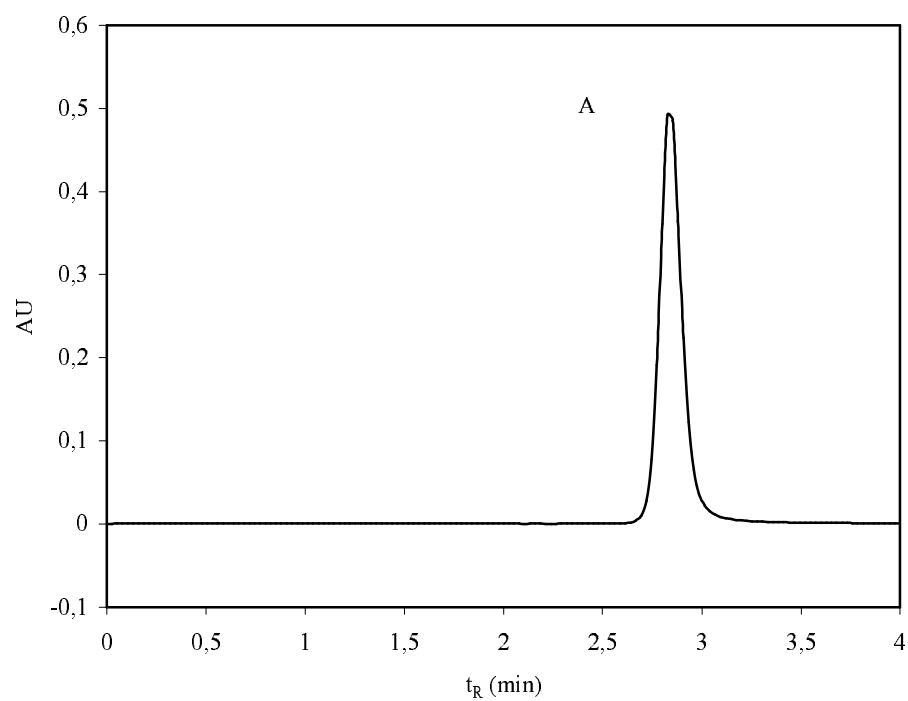
La linealidad del método propuesto fue determinada usando triplicados a 7 niveles diferentes de concentración. Las rectas de calibrado fueron obtenidas por regresión lineal de las áreas de pico frente a las respectivas concentraciones, siendo lineales en un rango de concentración de hasta 200 mg/l para un flujo de 1 ml/min y de 50 mg/l para un flujo de 0.5 ml/min. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8. Parámetros de la recta de calibrado para un flujo de 1 ml/min y 0.5 ml/min

Flujo	Ordenada en el origen	Pendiente	r	Desviación estándar
0.5 ml/min	0.0066±0.0009	0.0399±0.0002	0.9998	0.0135
1 ml/min	0.0049±0.0006	0.0200±0.0001	0.9997	0.0036

En la Figura 6.2 se representan los cromatogramas de cefepima a los flujos anteriormente mencionados, donde se observa que el tiempo de retención para la cefepima es de 2.8 min, para un flujo de 1 ml/min y de 5.6 min para un flujo de 0.5 ml/min.





*Figura 6.2.* Cromatogramas de cefepima en agua:  
(A) 100  $\mu\text{g/ml}$  (flujo de 1 ml/min), (B) 25  $\mu\text{g/ml}$  (flujo 0.5 ml/min).

#### **6.2.2.4.- Límites de detección y de cuantificación**

El límite de detección se calculó como se indicó en el capítulo 2, obteniéndose valores de 0.1mg/l y 0.08 mg/l para un flujo de 1ml/min y 0.5 ml/min, respectivamente.

En el caso del límite de cuantificación se obtuvieron valores de 0.3 mg/l y 0.24 mg/l para un flujo de 1ml/min y 0.5 ml/min, respectivamente.

#### **6.2.2.5.- Especificidad**

La cefepima puede ser administrada conjuntamente con otros principios activos en la terapia antibiótica. Por ello, se realizó un estudio de interferencia con estos principios activos y con otros con los que se suele comparar. En la Tabla 6.9 se muestran los resultados obtenidos; puede apreciarse la excelente especificidad del método, donde sólo un principio activo de los ensayados interfiere en la determinación.

Tabla 6.9. Especificidad del método

Fármaco	t <sub>R</sub>	Fármaco	t <sub>R</sub>
Ac. acetilsalicílico	ND	Metilprednisolona	ND
Amicacina	ND	Metoclopramida	ND
Amoxicilina/Ac. Clavulánico	ND	Midazolam	ND
Aztreonam <sup>a</sup>	2.27	Metamizol <sup>a</sup>	6.53
Cafeína	ND	Morfina	ND
Cefotaxima <sup>a</sup>	5.17	Moxifloxacino	ND
Cefoxitina <sup>a</sup>	6.96	Nitroglicerina	ND
Cefpiroma <sup>a</sup>	3.89	Omeprazol	ND
Ceftazidima <sup>a</sup>	2.32	Paracetamol	ND
Ceftriazona <sup>b</sup>	2.59	Penicilina G	ND
Ciprofloxacino	ND	Propofol	ND
Diclofenaco	ND	Rifampicina	ND
Fenitoína	ND	Sulbactam	ND
Furosemida	ND	Teicoplanina	ND
Gatifloxacino	ND	Teofilina <sup>a</sup>	6.00
Gentamicina	ND	Ticarcilina	ND
Grepafloxacino	ND	Tobramicina	ND
Haloperidol	ND	Tramadol	ND
Imipenem <sup>a</sup>	2.11	Trovafloracina	ND
Ketoprofeno	ND	Vancomicina	ND
Levofloxacino	ND		

ND = no detectado

<sup>a</sup> detectado pero no interfiere

<sup>b</sup> detectado pero interfiere

#### 6.2.2.6.- Robustez

Según las directrices de la ICH, la robustez debe ser uno de los primeros parámetros a considerar en el desarrollo de un método analítico, ya que si los resultados son susceptibles ante variaciones de los parámetros analíticos propuestos, se han de tomar las precauciones adecuadas para que leves variaciones no afecten a los resultados finales.

De esta forma, se observó que variaciones del pH de  $\pm 1.5$  unidades producían variaciones de sólo un 2% en la señal analítica de la cefepima.

Por otro lado la concentración del tampón fosfato usado en la fase móvil fue estudiada en un rango entre 10 mM y 100 mM, observándose variaciones de  $\pm 1.2\%$  en la señal, en el rango indicado.

En el caso de variaciones del flujo de la fase móvil se han observado grandes cambios al modificar este parámetro. Así, y con respecto a un flujo de 1 ml/min, si se cambia el flujo a 0.75 ml/min la señal analítica se incrementa en un 31%, mientras que si se cambia el flujo a 0.5 ml/min la señal aumenta en un 100%. Por otro lado, si se cambia el flujo a 1.250 ml/min, la señal decrece en un 18%.

### **6.3.- PROCEDIMIENTO PROPUESTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA**

Se propone un procedimiento para la determinación de la cefepima que consiste en el uso de una fase móvil compuesta por metanol:tampón fosfato a pH 7 en la proporción 25:75, en modo isocrático. La fase móvil se microfiltra a través de una membrana de nylon de 0.47  $\mu\text{m}$ , se desgasifica con helio o por ultrasonido, y se bombea con un flujo de 1 ml/min, en el caso de muestras de suero y orina, o de 0.5 ml/min en el caso de líquido cefalorraquídeo. Las medidas se realizan a una longitud de onda fijada de 256 nm.

Para el análisis de muestras de orina y líquido cefalorraquídeo se procede solo a una microfiltración de la muestra a través de una membrana de nylon de 0.47  $\mu\text{m}$ . Para el análisis de muestras de suero, se usó el procedimiento de extracción que se describe en el apartado de validación, con el que se consiguen recuperaciones prácticamente del 100%.

## 6.4.- DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

El método propuesto se aplica a la determinación de cefepima en suero, orina y líquido cefalorraquídeo.

### 6.4.1.- DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN SUERO

Como se indicó anteriormente las muestras de suero fueron tratadas según el esquema 6.1 para la extracción de la cefepima, y posteriormente microfiltradas a través de filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectadas en el sistema cromatográfico.

Se estudió la estabilidad de cefepima en suero conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En las Figuras 6.3 y 6.4 se representan el estudio de estabilidad de cefepima en suero almacenado a las dos temperaturas mencionadas durante un periodo de tres meses.

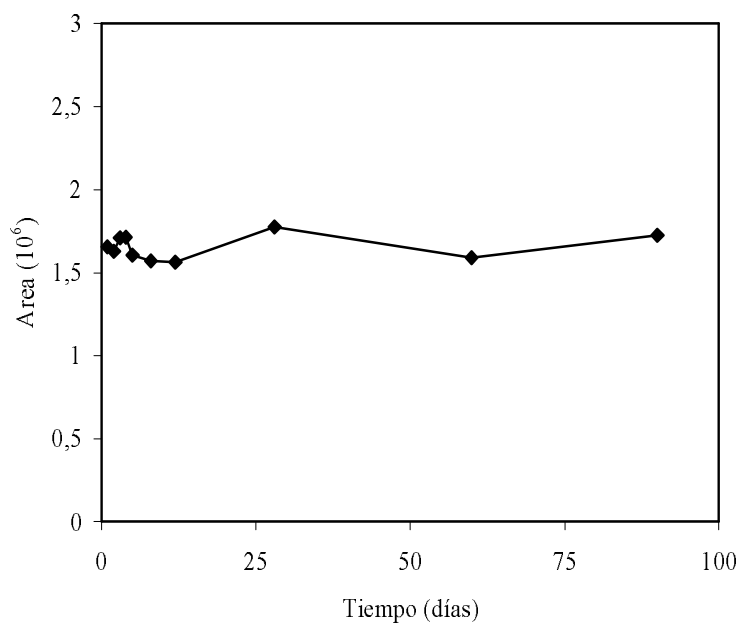


Figura 6.3. Estabilidad de cefepima en suero almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

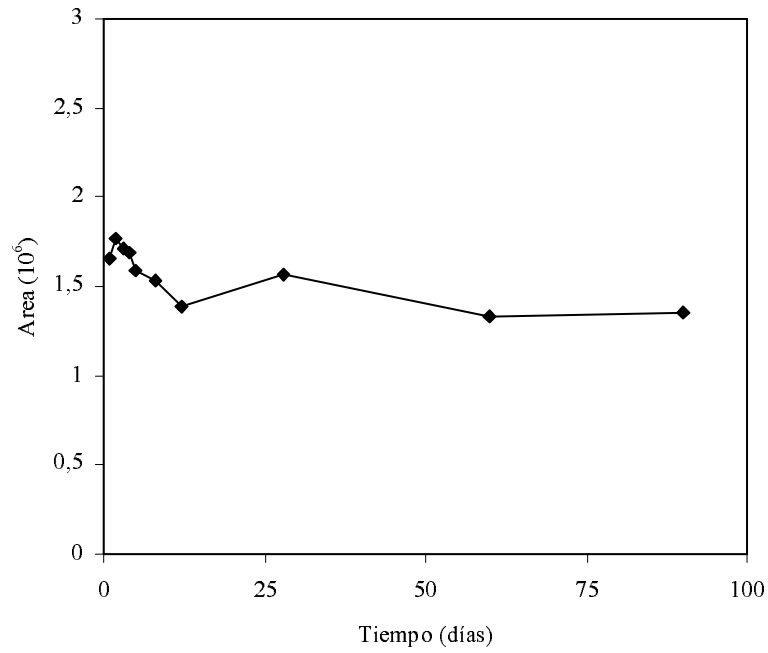


Figura 6.4. Estabilidad de cefepima en suero almacenado a -20°C.

Los resultados obtenidos en muestras de suero correspondientes a pacientes tratados con cefepima, descritos en la presente memoria (pág. 212), a distintos tiempos de toma de muestra dentro del periodo de dosificación, se muestran en la Tablas 6.10 y 6.11.

Tabla 6.10. Concentraciones en suero de los pacientes 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Tiempo (h)	Cefepima (mg/l)*en suero (Pacientes)					
	1	2	3	4	5	6
Antes administración	7.6 ± 0.6	6.9 ± 0.6	4.5 ± 0.8	1.7 ± 0.7	2.5 ± 0.1	17.1 ± 0.4
0.5	107 ± 5.8	70.9 ± 1.0	55.9 ± 1.1	28.8 ± 0.9	43 ± 0.4	79.9 ± 0.6
1	73.5 ± 4.0	44.7 ± 1.2	33.8 ± 1.0	22.6 ± 1.1	27.7 ± 0.5	57.3 ± 1.1
2	47.6 ± 2.2	28.1 ± 0.7	21.4 ± 0.5	15.3 ± 0.7	15.9 ± 0.01	48 ± 1.0
3	30.5 ± 1.1	18.5 ± 1.1	16.2 ± 0.8	9.3 ± 0.8	10.4 ± 0.06	41.1 ± 0.1
4	25.1 ± 1.5	10.5 ± 0.8	12.7 ± 0.7	7.1 ± 0.5	5.3 ± 0.25	37.2 ± 0.3
5	--- <sup>a</sup>	8.1 ± 0.3	10.4 ± 0.3	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>
6	14.7 ± 0.1	4.8 ± 1.2	7.7 ± 0.9	4.3 ± 0.9	2.5 ± 0.01	29.1 ± 0.4
7	--- <sup>a</sup>	2.7 ± 0.2	7.2 ± 0.3	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>
8	11.9 ± 0.3	2.3 ± 0.9	6.5 ± 0.9	2.9 ± 0.4	--- <sup>a</sup>	21 ± 0.4

\* media ± s<sub>n-1</sub> (n=3)<sup>a</sup> muestras no suministradas

Tabla 6.11. Concentraciones en suero de los pacientes 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tiempo (h)	Cefepima (mg/l)* en suero (Pacientes)					
	7	8	9	10	11	12
Antes administración	1.2 ± 0.04	1.3 ± 0.01	1.3 ± 0.04	2.3 ± 0.1	16.2 ± 0.7	6.3 ± 0.5
0.5	65.5 ± 0.4	69.1 ± 1.3	116.7 ± 0.6	78 ± 2.6	116.8 ± 1.8	103.8 ± 2
1	30.5 ± 0.3	35.4 ± 0.3	41.1 ± 0.2	42.2 ± 1.3	45.2 ± 1.6	65.2 ± 2.2
1.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	29.1 ± 1	39 ± 0.6	--- <sup>a</sup>
2	18.3 ± 0.5	24.6 ± 0.5	29.7 ± 0.4	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	46.8 ± 1.6
2.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	16 ± 0.5	34.69 ± 0.9	--- <sup>a</sup>
3	8.3 ± 0.1	--- <sup>a</sup>	18.9 ± 0.7	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	29.3 ± 0.4
3.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	10.3 ± 0.21	26.9 ± 0.8	--- <sup>a</sup>
4	4.3 ± 0.3	16.4 ± 0.7	11.6 ± 0.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	22.9 ± 0.5
4.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	7.7 ± 0.2	18.9 ± 0.7	---
5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	7.1 ± 0.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	16.2 ± 0.3
5.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	6 ± 0.1	16 ± 0.2	--- <sup>a</sup>
6	2.4 ± 0.1	7 ± 0.2	4.3 ± 0.1	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	11.2 ± 0.3
7	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	2.15 ± 0.1	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>
7.5	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	3.9 ± 0.1	13.5 ± 0.3	--- <sup>a</sup>
8	0.6 ± 0.02	2.4 ± 0.1	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	--- <sup>a</sup>	6.7 ± 0.3

\* media ± s<sub>n-1</sub> (n=3)<sup>a</sup> muestras no suministradas

Se compararon los resultados obtenidos con otros métodos cromatográficos propuestos por otros autores [136, 142] y se recogen en la Tabla 6.12.



Tabla 6.12. Comparación con otros métodos en muestras de suero.

Paciente	Método propuesto (mg/l cefepima)*	Método referencia bibliográfica 142			Método referencia bibliográfica 136		
		mg/l	t de	Contraste	mg/l	t de	Contraste
		cefepima*	Student	F	cefepima*	Student	F
7	65.5 ± 0.45	64.7 ± 0.8	1.69	3.2	66.1 ± 1.1	0.85	6.05
8	69.1 ± 1.3	70.1 ± 1.5	0.55	1.33	70.6 ± 1.6	0.98	1.51

\*media±s<sub>n-1</sub> (n=3)

Tal y como se puede comprobar los valores de t son menores que el valor crítico de t, que es de 2.78 (P = 0.05), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y los otros ensayados. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 (P = 0.05).

#### 6.4.2.-DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Como se ha indicado, las muestras de líquido cefalorraquídeo no necesitan tratamiento previo a su determinación, sólo ser microfiltradas a través de filtros de nylon de 0.45 µm antes de ser inyectadas en el sistema cromatográfico.

Los resultados obtenidos en muestras de líquido cefalorraquídeo correspondientes a pacientes tratados con cefepima, descritos en la presente memoria (pág. 212), a distintos tiempos de toma de muestra dentro del periodo de dosificación, se muestran en la Tabla 6.13.

Tabla 6.13. Concentraciones en líquido cefalorraquídeo de los pacientes 1, 2, 3, 4, y 10.

Tiempo (h)	Cefepima (mg/l)* en líquido cefalorraquídeo (Pacientes)	
	1	2
Antes administración	12.5 ± 0.4	1.8 ± 0.3
0.5	11.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2
1	14.3 ± 0.1	7.4 ± 0.8
2	15.8 ± 0.5	6.4 ± 0.2
3	15.5 ± 0.1	5.9 ± 0.5
4	15.0 ± 0.1	5.5 ± 0.7
5	---	4.2 ± 0.8
6	13.6 ± 0.3	3.5 ± 0.8
7	---	2.6 ± 0.4
8	13 ± 0.4	2.1 ± 0.2

\*media±s<sub>n-1</sub> (n=3)

Se compararon los resultados obtenidos con otros métodos cromatográficos propuestos por otros autores [136, 142] y se recogen en la Tabla 6.14.

Tabla 6.14. Comparación con otros métodos en muestras de LCR.

Paciente	Método Propuesto (mg/l cefepima)*	Método referencia bibliográfica 142			Método referencia bibliográfica 136		
		mg/l cefepima*	t de Student	Contraste F	ppm cefepima*	t de Student	Contraste F
		1	15.8 ± 0.5	14.8 ± 0.6	1.58	1.44	15 ± 0.3
2	6.4 ± 0.2	6 ± 0.9	0.54	20.25	5.8 ± 0.4	1.66	4

\*media±s<sub>n-1</sub> (n=3)

Tal y como se puede comprobar los valores de t son menores que el valor crítico de t, que es de 2.78 ( $P = 0.05$ ), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y los otros ensayados. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 ( $P = 0.05$ ).

#### 6.4.3.- DETERMINACIÓN DE CEFEPIMA EN ORINA

Como se ha indicado, las muestras de orina sólo necesitaron ser microfiltradas a través de filtros de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  antes de ser inyectadas en el sistema cromatográfico.

En la Tabla 6.15 se muestran los resultados obtenidos en muestras de orina correspondientes a pacientes tratados con cefepima, descritos en la presente memoria (pág. 212), a distintos tiempos de toma de muestra.

Tabla 6.15. Concentraciones en orina de los pacientes 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Tiempo (h)	Cefepima (mg/l)*en orina (Pacientes)							
	5	6	7	8	9	10	11	12
Antes administración	---	1060±1.8	---	250.5±0.1	349.2±0.8	699.1±1.2	104±0.6	3587.8±2.1
posterior administración	3000±1.8	1112±0.9	69.2±0.8	270.7±2	140.43±1.1	355.6±0.7	1459.4±1.9	1193.1±1.8

\*media±s<sub>n-1</sub> (n=3)

Se compararon los resultados obtenidos con otros métodos cromatográficos propuestos por otros autores [136, 142] y se recogen en la Tabla 6.16.

Tabla 6.16. Comparación con otros métodos en muestras de orina.

Paciente	Método propuesto (mg/l cefepima)*	Método referencia bibliográfica 142			Método referencia bibliográfica 136		
		mg/l cefepima*	t de Student	Contraste F	ppm cefepima*	t de Student	Contraste F
8	250.5±0.14	251±0.24	2.27	2.9	250.7±0.14	1.25	1
12	1193.1±1.8	1190.5±2.3	1.11	1.63	1194.2±3.1	0.37	2.96

\* media±s<sub>n-1</sub> (n=3)

Tal y como se puede comprobar los valores de t son menores que el valor crítico de t, que es de 2.78 (P = 0.05), por lo que se acepta que no existen diferencias significativas entre el método propuesto y los otros ensayados. También se utilizó el contraste F de dos colas para comparar la precisión, obteniéndose valores inferiores al crítico, que es de 39 (P = 0.05).

## 6.5.- COMPARACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO CON OTROS EXISTENTES

Después de realizar una revisión bibliográfica de otros métodos por cromatografía líquida de alta eficacia donde se determina cefepima en distintos fluidos biológicos, se procedió a comparar estos métodos con el propuesto. De esta comparación se obtiene la conclusión de que el método propuesto en esta memoria es más sensible que los encontrados en bibliografía. En la Tabla 6.17 se muestra la comparativa entre los distintos métodos cromatográficos, donde se puede observar que el método propuesto proporciona unos de los valores más bajos en tiempo de retención con un flujo de 1ml/min, y el que presenta mejores valores de límites de detección y cuantificación; siendo así, un método apropiado para la determinación de la cefepima por cromatografía líquida de alta eficacia.



---

**ANEXO**

En el marco de colaboración entre el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla y el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, se estudian muestras de plasma, de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de orina de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y en el área de infecciosos, a los que se les administró cefepima. Estas muestras fueron analizadas para determinar la concentración del citado fármaco, tal y como se ha descrito en el capítulo 6. Con los datos obtenidos, y realizando un estudio farmacocinético y farmacodinámico, se obtuvieron algunas conclusiones clínicas, que son objeto del presente estudio.

### **A.1.- INTRODUCCIÓN**

Según los estudios de prevalencia Europeos de infección en UCI, el 20.6% de los pacientes ingresados padecen una infección nosocomial, cuyos cuadros infecciosos más frecuentes por orden de frecuencia son: neumonía (47%), infección del tracto respiratorio inferior (17.6%) y bacteriemia (12%) [176].

La incidencia de la neumonía nosocomial es distinta según se trate de una unidad con pacientes quirúrgicos y/o traumáticos, que una unidad médica o coronaria. Así, las tasas de infección más elevadas se encuentran en las primeras siendo la segunda causa de muerte en pacientes que sobreviven inicialmente a un trauma. La incidencia de neumonía nosocomial en pacientes traumatizados severamente enfermos varía desde un 4 hasta un 87% y la mortalidad varía entre un 6 y un 59%.

Las infecciones nosocomiales representan una complicación común en pacientes críticamente enfermos, sobre todo en los que requieren ventilación mecánica. Las alteraciones en las defensas fisiológicas y anatómicas en pacientes con traumas severos predisponen al desarrollo de neumonía. Los factores que favorecen las infecciones bacterianas en estos pacientes son: colonización de vías aéreas superiores, lesiones traumáticas que requieren cirugía, el trauma “per se” induce una alteración de las barreras anatómicas normales, el tratamiento con barbitúricos o sedantes en pacientes con edema cerebral, que inducen un efecto inmunodepresivo, así como la pérdida masiva de sangre, que produce una pérdida de proteínas inmunoprotectoras.

Los esfuerzos deben ir encaminados a realizar un adecuado diagnóstico microbiológico ya que los diagnósticos inadecuados o imprecisos conducen a aplicar tratamientos de amplio espectro, muy costosos o potencialmente tóxicos.

El antibiótico empírico de elección debe cumplir una serie de requisitos: espectro antibacteriano eficaz frente a los posibles patógenos a cubrir, efecto sinérgico con otros antimicrobianos, administración por vía intravenosa, resistencia a la hidrólisis de las betalactamasas, baja inducción de las mismas, buena penetración en tejido pulmonar, escasa toxicidad y efectos secundarios, escasa acción sobre la flora intestinal, y una concentración plasmática superior a la CMI<sub>90</sub> de la mayoría de los patógenos implicados.

Cefepima es un antibiótico que cumple todos estos requisitos, siendo una buena elección para el tratamiento de neumonías nosocomiales en UCI.

## **A.2.-DISEÑO DEL ESTUDIO DE CEFEPIMA EN PACIENTES HOSPITALIZADOS**

A continuación se hace referencia al diseño del estudio de cefepima en muestras biológicas.

### **A.2.1.- POBLACIÓN**

Se eligen pacientes mayores de 18 años ingresados en UCI de Traumatología por haber sufrido un traumatismo grave y que desarrollan durante el ingreso hospitalario criterios diagnósticos de neumonía nosocomial, y pacientes ingresados en área de infecciosos que desarrollan neumonía nosocomial y meningitis postquirúrgica. De todos los pacientes se obtiene su consentimiento informado antes de la extracción de las muestras.

Se excluyen del estudio a pacientes con hipersensibilidad a cefalosporinas y embarazadas o en período de lactancia.



### **A.2.2.- TRATAMIENTO**

Las dosis de cefepima administrada a cada paciente son de 1 ó 2g cada 8 horas, según criterio clínico.

La duración del tratamiento es de 5 días como mínimo y se mantiene hasta que el paciente se mantenga afebril durante al menos 48 horas.

### **A.2.3.- CRITERIOS DE INTERRUPCIÓN**

Los criterios que se utilizaron para la interrupción del tratamiento son:

- Fin del tratamiento
- Intolerancia o efectos adversos
- Microorganismos resistentes a la cefepima
- Ausencia de mejoría clínica

### **A.2.4.- METODOLOGÍA**

Se tomaron muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo correspondientes a tiempo 0 (inmediatamente antes de la administración de la dosis), 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas posteriores a la administración de la dosis. Las muestras de orina se recogieron al comienzo y al final de la administración de la dosis.

Normas para extraer las muestras

1. Extraer sangre al paciente en tubos con anticoagulante. El anticoagulante será EDTA (vacutainer con tapón violeta) o ACD (vacutainer con tapón amarillo).
2. Se extraerá un tubo de 10 ml para obtener plasma en suficiente cantidad que permita hacer alícuotas.
3. Una vez obtenidas las muestras se centrifugarán a 200g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Si el paso 4 no se puede realizar, se pasa al punto 5.

4. No es imprescindible pero sería conveniente separar el plasma en otro tubo con cuidado de no arrastrar la capa roja y centrifugar de nuevo a 800-1000 g durante 15 minutos más para eliminar completamente las plaquetas y los detritus celulares.
5. Se añade el plasma en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Es conveniente realizar al menos 2 alícuotas de cada muestra y en cada una de ellas se debe recoger al menos 0.5 ml.
6. Los tubos deben ser identificados con las iniciales del paciente, la fecha de extracción y el número de extracción que corresponde.
7. Se procederá a la congelación de las muestras que se realizará a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
8. El tiempo máximo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta la congelación del plasma deberá ser como máximo de 6 horas.
9. Una vez obtenidas las muestras se enviarán en las condiciones adecuadas al centro donde se realizarán las determinaciones.
10. El transporte de las muestras debe realizarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  con hielo seco o con acumuladores de frío en recipientes adecuados (caja-nevera o caja de poliespan).
11. Se extraen LCR de la válvula de derivación, y se mantendrán congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento al igual que las de orina.

Antes del análisis por cromatografía líquida de alta eficacia, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Las muestras fueron tratadas para su determinación tal y como se indicó en el capítulo 6.

### **A.3.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO.**

Cuando se inicia un tratamiento antimicrobiano en pacientes multitraumatizados, hay que tener en cuenta ciertas características farmacocinéticas. El volumen de distribución y el aclaramiento de algunos fármacos como por ejemplo los aminoglucósidos es más alto por lo que puede ser complicado el alcanzar adecuados niveles de los antimicrobianos en el plasma. Hay ocasiones en las que un tratamiento antimicrobiano correcto según el microorganismo aislado no resulta eficaz en pacientes

traumatizados severos. Este fracaso terapéutico puede ser debido a una alteración en la distribución y concentración del fármaco en estos pacientes.

Las características propias de los pacientes con traumas severos pueden influir de manera diferente en la distribución de antimicrobianos pero no hay datos publicados suficientes que apoyen o rebatan esta posibilidad.

La determinación de las concentraciones plasmáticas de cefepima y su correlación con la evolución clínica en pacientes subsidiarios del empleo de esta cefalosporina, se encuentra estrechamente correlacionada con varios parámetros. Así a la hora de poder establecer los niveles plasmáticos reales, es necesario disponer de ciertos datos diseñado para el estudio clínico (función hepática y renal, niveles de proteínas,...). Así mismo es fundamental indicar si existe un tratamiento concomitante para poder valorar las interacciones farmacocinéticas que pudieran dar lugar a variaciones en los niveles plasmáticos del fármaco objetivo del estudio. Por ello se debe indicar en el informe de recogida de datos clínicos el fármaco utilizado, la dosis y la pauta de administración.

La cefepima puede ser así mismo, una alternativa posible para el tratamiento empírico de infecciones del sistema nervioso central (SNC). La documentación existente sobre la farmacocinética de cefepima en LCR es muy limitada [102, 177-179], por lo que se realizará un subestudio en LCR, utilizando para ello muestras de los pacientes incluidos en el estudio previo y que sean portadores de una válvula de derivación como consecuencia de la existencia de una patología no infecciosa. La existencia de la válvula permite la extracción de LCR sin la realización de maniobras que sean traumáticas para el paciente.

Los datos obtenidos en las curvas de niveles plasmáticos se ajustaron a un modelo farmacocinético compartimental [180], cuyas ecuaciones utilizadas para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se encuentran recogidos en la Tabla A.1[181].

Tabla A.1. Ecuaciones utilizadas en el cálculo de los parámetros farmacocinéticos.

PARÁMETROS	MODELO COMPARTIMENTAL	
	MONOCOMPARTIMENTAL	BICOMPARTIMENTAL
Ecuación representativa del modelo	$\log C = -k_{el}/2.303 t + \log C_0$	$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t}$
Semivida biológica	$t_{1/2} = \ln 2/k_{el}$	$t_{1/2} = \ln 2/\beta ; t_{\alpha 1/2} = \ln 2/\alpha$
Volumen de distribución	$Vd = D/C_0$	$Vd = Vc + Vp = Vc[1 + (k_{12} / k_{21})]$
Aclaramiento plasmático	$Cl_p = Vd k_{el}$	$Cl_p = Vc k_{el}$
Área bajo la curva (método de los trapecoides)	$AUC_0^\infty = AUC_0^t + AUC_t^\infty =$ $= \sum_0^t \Delta t \frac{C_{t-1} + C_t}{2} + C_t / k_{el}$	$AUC_0^\infty = AUC_0^t + AUC_t^\infty =$ $= \sum_0^t \frac{(t_n - t_{n-1})(C_{t-1} + C_t)}{2} + C_t / \beta$
Concentración plasmática a tiempo 0		$C_0 = A_0 + B_0$
Microconstante de distribución $k_{21}$		$k_{21} = (B_0 \alpha) + (A_0 \beta) / C_0$
Microconstante de distribución $k_{12}$		$k_{12} = \alpha + \beta - (k_{21} + k_{el})$
Microconstante de distribución $k_{el}$		$k_{el} = \alpha \beta C_0 / (B_0 \alpha) + (A_0 \beta)$

donde  $\alpha$  y  $\beta$  se denominan macroconstantes rápida y lenta de disposición, respectivamente, y D es la dosis.

Como consecuencia de que los antibióticos tienen una actividad bactericida tiempo dependiente y carecen de efecto postantibiótico prolongado [182], la herramienta fundamental para un adecuado tratamiento es mantener una concentración del antibiótico en plasma o en el lugar de la infección superior a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del microorganismo causal durante la mayor parte del intervalo de dosificación.

Por ello se considera de interés analizar en este estudio, parámetros farmacodinámicos. De los parámetros comúnmente más utilizados, los más importantes son [182,183]:

- ✓  $t_{\text{supraCMI}}$  o tiempo en que el antimicrobiano está por encima de la CMI (se expresa como porcentaje del periodo de dosificación), y para ello es preciso conocer la CMI para la cefepima siempre que se haya aislado algún patógeno y que este aislamiento esté directamente relacionado con la infección.
- ✓ la relación  $C_{\text{máx}}/\text{CMI}$  o cociente inhibitorio, que es la relación entre la concentración plasmática y el valor de la CMI. Numerosos estudios han confirmado que este índice es un importante predictor del resultado terapéutico. Además se ha comprobado que valores elevados de este índice evitan la selección de cepas resistentes y aumentan el efecto postantibiótico.

Una vez calculado el tiempo de permanencia de la concentración del fármaco por encima de la CMI, en el estudio farmacodinámico, se considerará que la cefepima, al igual que el resto de las cefalosporinas, tiene una buena actividad si el tiempo de permanencia de la concentración del fármaco por encima de 4.3 veces la CMI es superior al 70% del período interdosis para bacterias Gram negativas y *Streptococcus sp.* Y superior al 40% para *Staphylococcus sp.* [184-186]. En el caso de meningitis, el criterio establecido es que las concentraciones en LCR sean superiores al 90% [187].

A continuación se detallarán los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos correspondientes a cada paciente incluido en el presente estudio.

**PACIENTE 1**

## ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 69                      Peso: 70                      Altura: 1.65                      Sexo: hembra

Diagnóstico: carcinoma y meningitis posquirúrgica

Dosis administrada: 2gramos cada 8 horas

Otros tratamientos: ninguno

Traumatismo: quirúrgico

Volumen de sustitutivos del plasma administrado al paciente : ninguno

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS Y EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

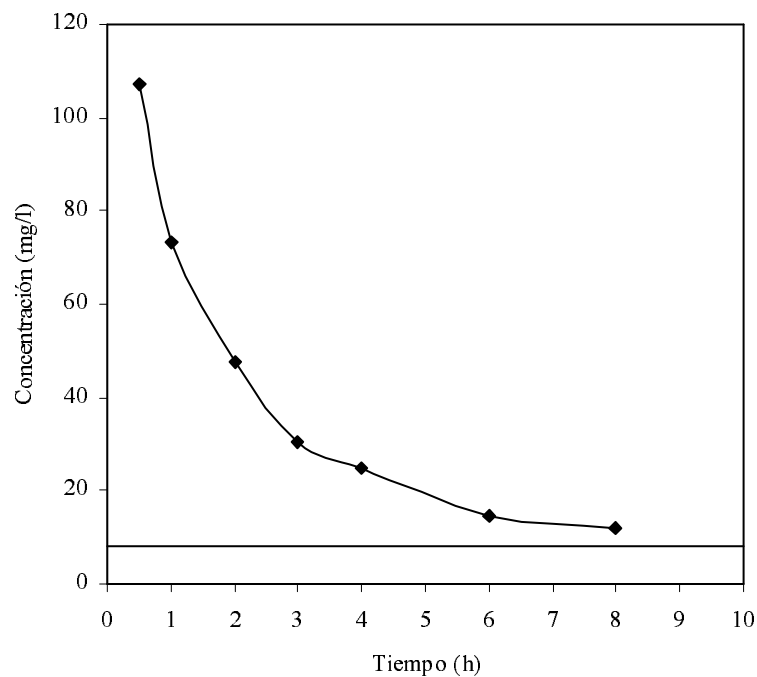


Figura A.1. Curva de niveles plasmáticos del paciente 1.

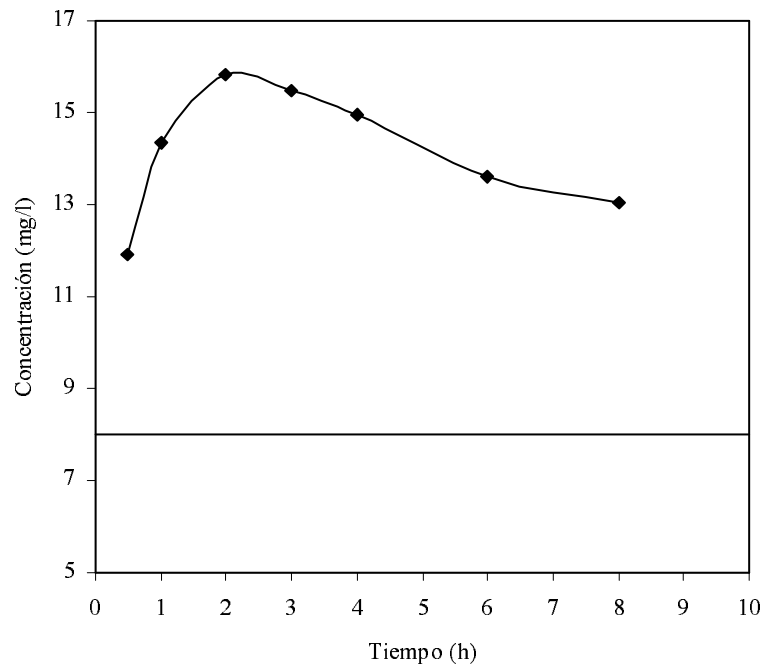


Figura A.2. Curva de niveles en líquido cefalorraquídeo de cefepima en el paciente 1.

### ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

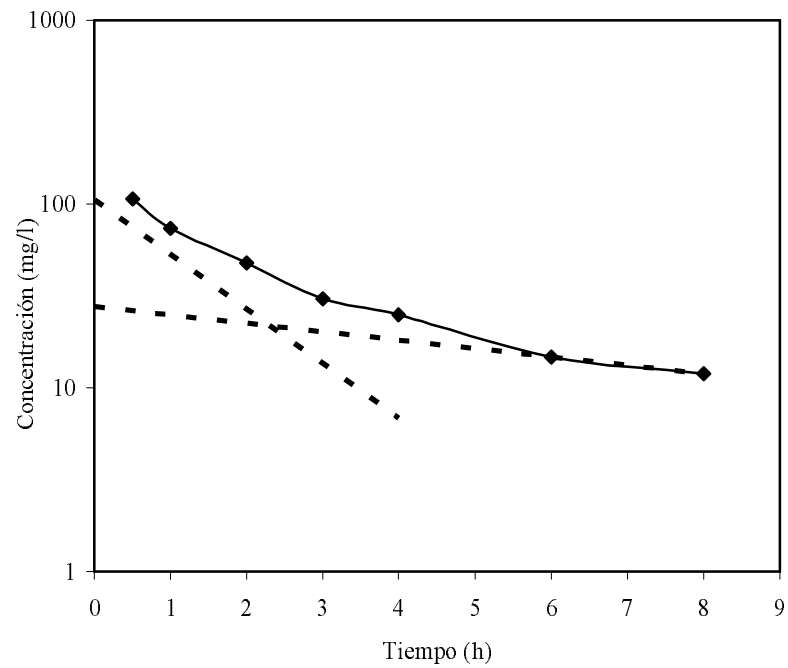


Figura A.3. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 1.

$$C = 105,1 e^{-0,716t} + 27,72 e^{-0,105t}$$

$$C_0 = 132.82 \text{ mg/l} \quad \alpha = 0.716 \text{ h}^{-1}$$

$$\beta = 0.105 \text{ h}^{-1} \quad k_{21} = 0.232 \text{ h}^{-1}$$

$$K_{el} = 0.323 \text{ h}^{-1} \quad k_{12} = 0.266$$

$$AUC^{\infty}_0 = 418 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 6.6 \text{ h} \quad t_{\alpha 1/2} = 0.96 \text{ h}$$

$$Vd = 32.30 \text{ l}$$

$$Cl = 4.86 \text{ l/h}$$

$$C_{\text{máx}}/CMI = 13.37 \quad t_{\text{supra}CMI} = 100\%$$

## PACIENTE 2

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 63      Peso: 90      Altura: 1.65      Sexo: hembra

Diagnóstico: hematoma en cerebelo con hidrocefalia obstructiva y meningitis posquirúrgica

Dosis administrada: 2 gramos cada 8 horas

Otros tratamientos : sintróm

Otras: HTA, obesidad.

Volumen de sustitutos del plasma administrado al paciente : ninguno



➤ CURVA DE NIVELES PLASMÁTICOS Y EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

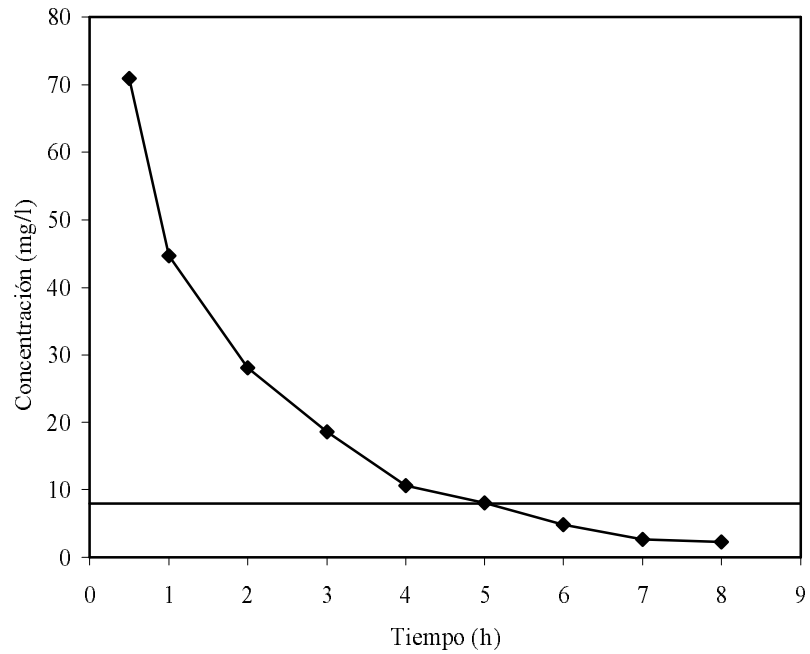


Figura A.4. Curva de niveles plasmáticos del paciente 2

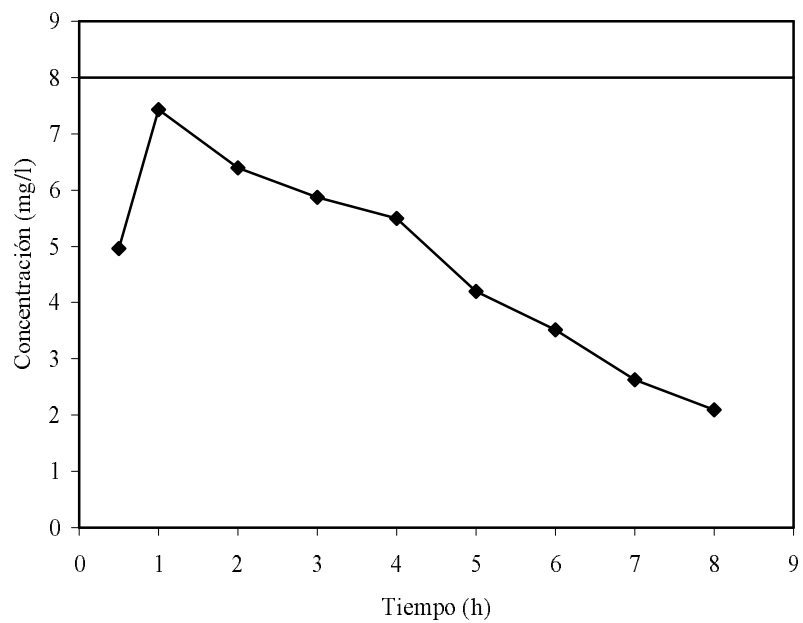


Figura A.5. Curva de niveles en líquido cefalorraquídeo de cefepima en el paciente 2

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

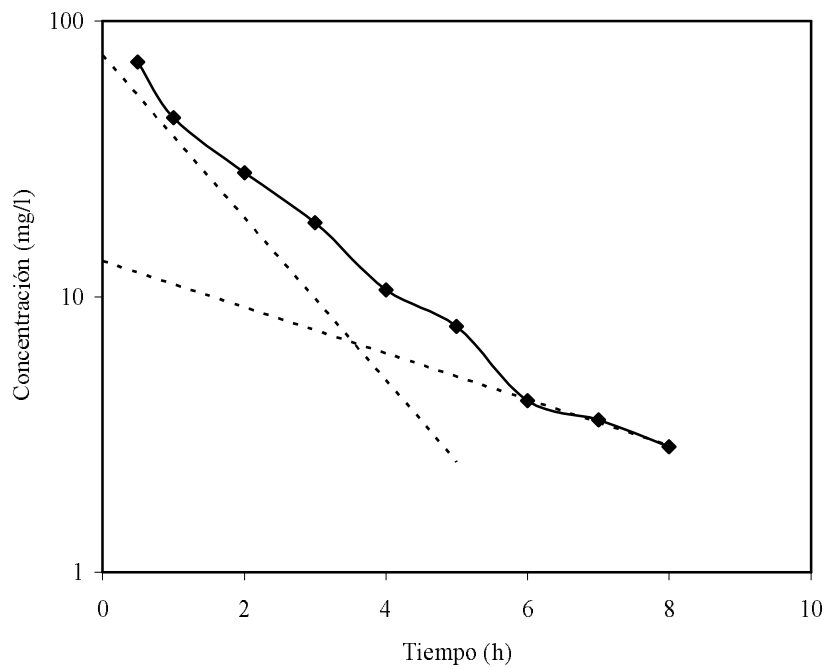


Figura A.6. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 2.

$$C = 74,88 e^{-0,678t} + 13,43 e^{-0,192t}$$

$$C_0 = 88,31 \text{ mg/l} \quad \alpha = 0,678$$

$$\beta = 0,192 \quad k_{21} = 0,265$$

$$k_{el} = 0,489 \text{ h}^{-1} \quad k_{12} = 0,166$$

$$AUC^{\infty}_0 = 183,7 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 3,6 \text{ h} \quad t_{\alpha 1/2} = 1,02 \text{ h}$$

$$Vd = 32,5 \text{ l} \quad Cl_p = 11,05 \text{ l/h}$$

$$C_{\text{máx}}/CMI = 8,86 \quad t_{\text{supra}} CMI = 62,5\%$$

**PACIENTE 3**

## ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 63    Peso: 70    Altura: 1.7    Sexo: varón

Diagnóstico: bronquitis crónica muy severa

Dosis administrada: 1g cada 8 horas

Otros tratamientos: seguril, furosemida, omeprazol, teofilina

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente : ninguno

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS Y EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

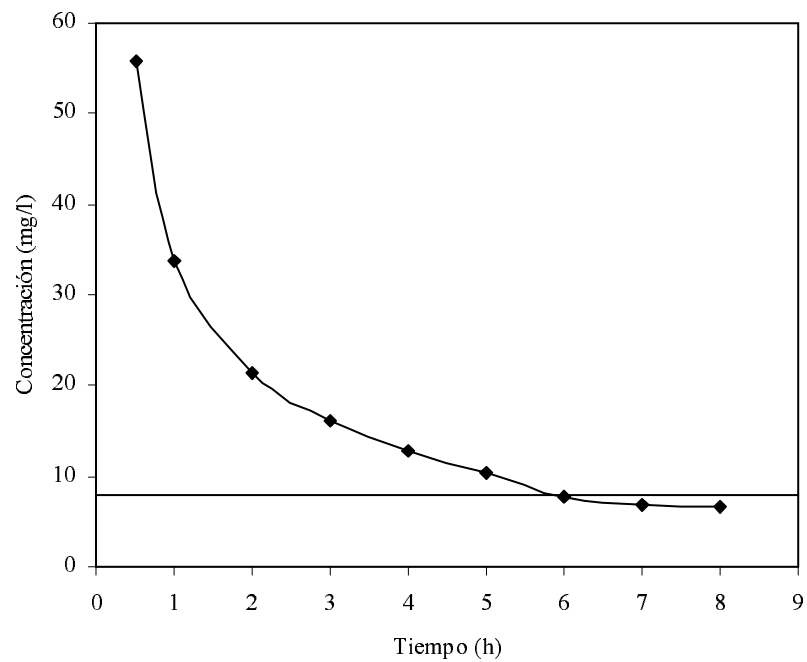


Figura A.7. Curva de niveles plasmáticos del paciente 3.

NO DETECTADO NIVELES DE CEFEPIMA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

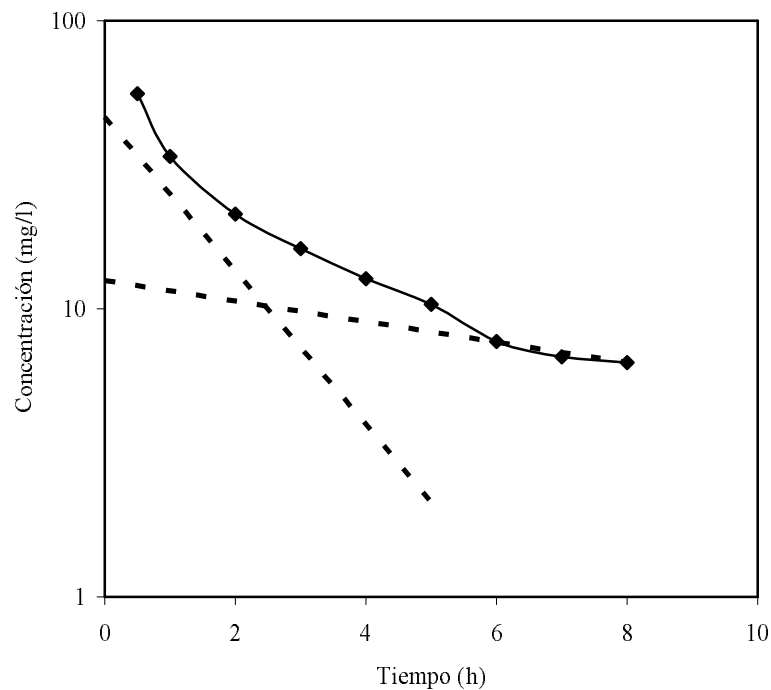


Figura A.8. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 3.

$$C = 46,26 e^{-0,636 t} + 12,5 e^{-0,083 t}$$

$$C_0 = 58.76 \text{ mg/l} \quad \alpha = 0.636 \text{ h}^{-1}$$

$$\beta = 0.083 \text{ h}^{-1} \quad k_{21} = 0.2 \text{ h}^{-1}$$

$$K_{el} = 0.263 \text{ h}^{-1} \quad k_{12} = 0.256 \text{ h}^{-1}$$

$$AUC_0^\infty = 233.08 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 8.35 \text{ h} \quad t_{\alpha 1/2} = 1.09 \text{ h}$$

$$Vd = 38.78 \text{ l} \quad Cl = 4.47 \text{ l/h}$$

$$C_{m\acute{a}x}/CMI = 6.98 \quad t_{supra} CMI = 75\%$$

**PACIENTE 4**

## ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 64    Peso: 60    Altura: 1.55    Sexo: hembra

Diagnóstico: neumonía nosocomial no grave

Dosis administrada: 1 g cada 8 horas

Otros tratamientos: omeprazol y metamizol

Traumatismo: craneal

Volumen de sustitutos del plasma administrado al paciente: 105 ml/hora (2.5 l/24 horas)

## ➤ CURVA DE NIVELES PLASMÁTICOS

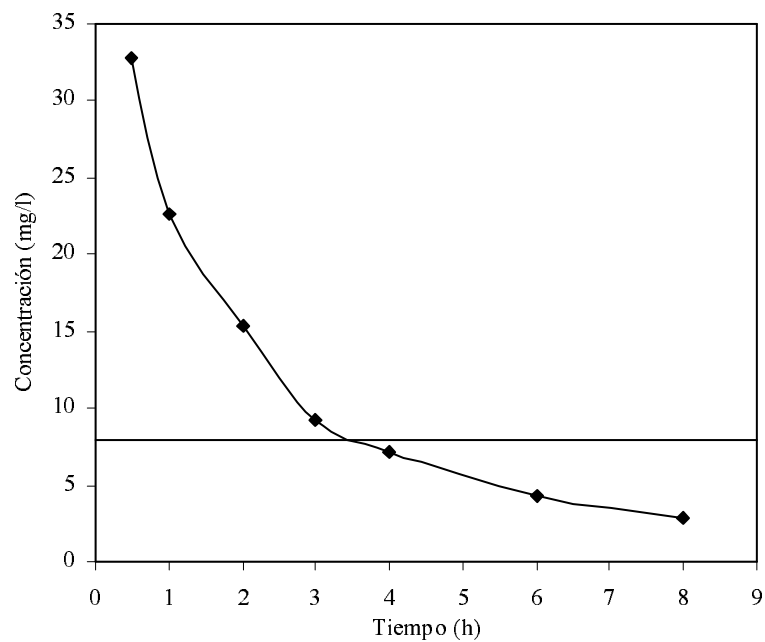


Figura A.9. Curva de niveles plasmáticos del paciente 4.

NO DETECTADO NIVELES DE CEFEPIMA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

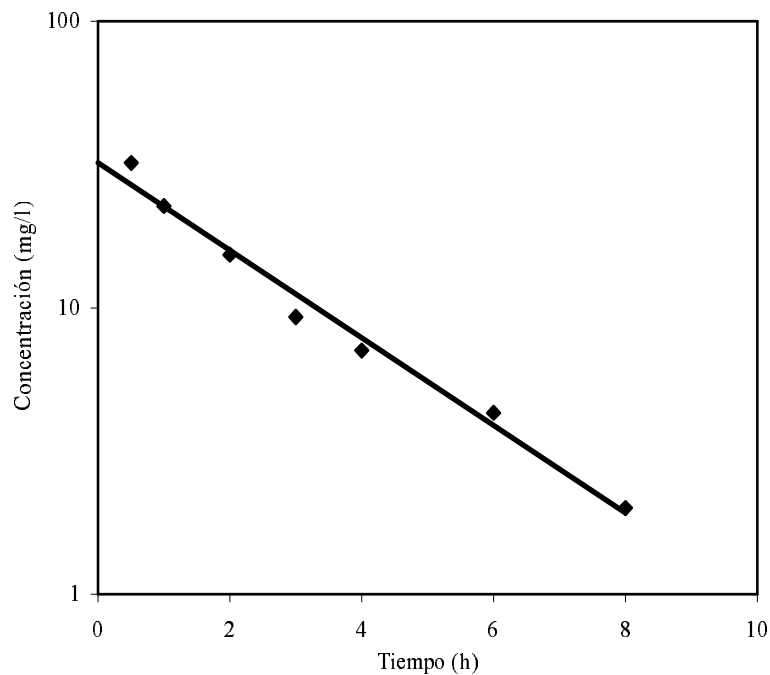


Figura A.10. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 4.

$$\begin{aligned}
 C &= 32.04 e^{-0.351 t} & k_{el} &= 0.351 \text{ h}^{-1} \\
 C_0 &= 32.04 \text{ mg/l} & AUC_{\infty}^0 &= 95.67 \text{ mg h l}^{-1} \\
 t_{1/2} &= 1.97 \text{ h} & V_d &= 31.21 \text{ l} & Cl_p &= 10.95 \text{ l/h} \\
 C_{\text{máx}}/C_{\text{MI}} &= 4 & t_{\text{supraCMI}} &= 42.5\%
 \end{aligned}$$

## PACIENTE 5

➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 20    Peso: 75    Altura: 1.7    Sexo: varón

Diagnóstico: neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: midazolam, amicacina y metamizol

Traumatismo: craneal

Volumen de sustitutos del plasma administrado al paciente: 204 ml/hora (4.9 l/24 horas)

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

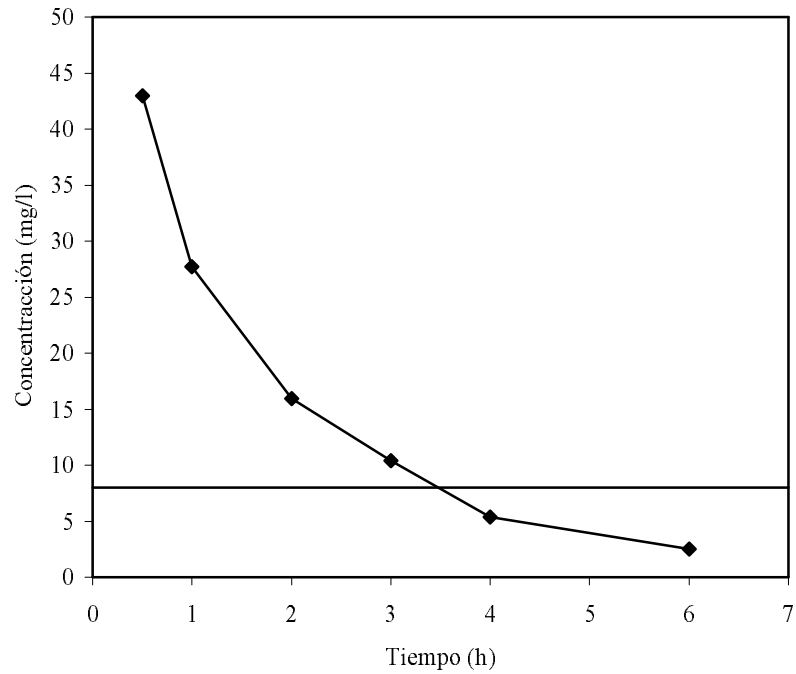


Figura A.11. Curva de niveles plasmáticos del paciente 5.

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

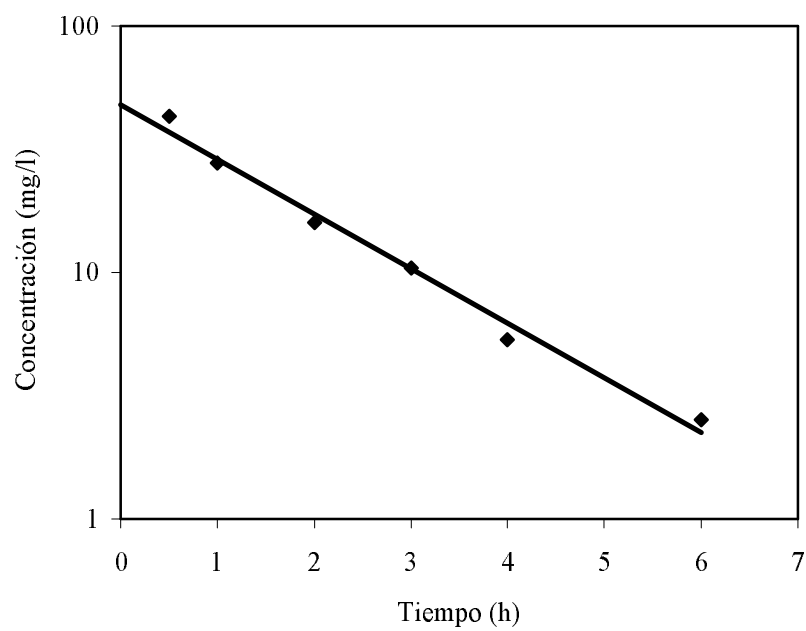


Figura A.12. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 5.

$$C = 47.95 e^{-0.51 t}$$

$$k_{el} = 0.51 \text{ h}^{-1}$$

$$C_0 = 47.95 \text{ mg/l}$$

$$AUC_{\infty}^0 = 100.24 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 1.35 \text{ h}$$

$$Vd = 41.71 \text{ l}$$

$$Cl_p = 21.27 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al final del periodo de dosificación = 3 g/l

$$C_{m\acute{a}x}/CMI = 5.37$$

$$t_{supra}CMI = 43.75\%$$

## PACIENTE 6

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 37    Peso: 70    Altura: 1.7    Sexo: varón

Diagnóstico: neumonía precoz

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: midazolam, vancomicina, furosemida, cloruro mórfico y omeprazol

Traumatismo: Craneal

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente: 260 ml/h (6.3 l/24 horas)

### ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

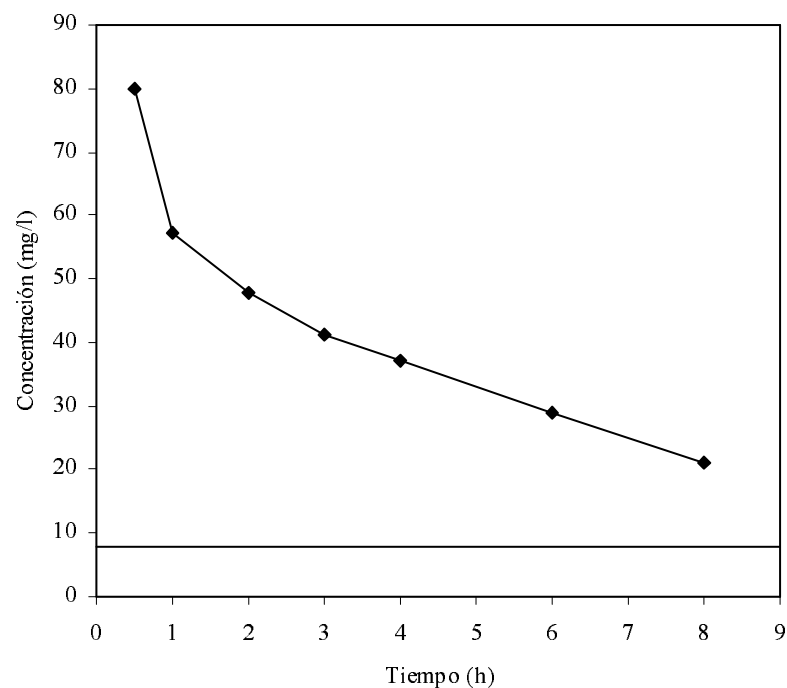


Figura A. 13.. Curva de niveles plasmáticos del paciente 6.



➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

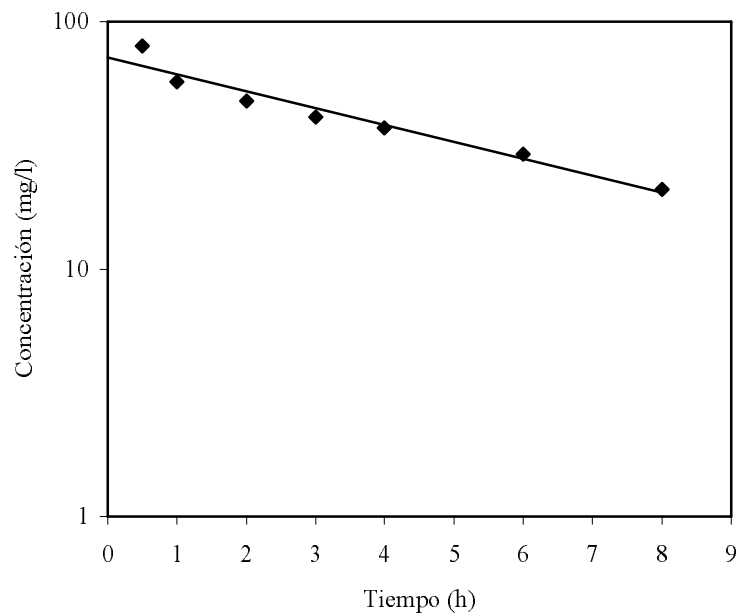


Figura A.14. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 6.

$$C = 71.56 e^{-0.157 t} \quad k_{el} = 0.157 \text{ h}^{-1}$$

$$C_0 = 71.56 \text{ mg/l} \quad AUC_{\infty}^o = 464.66 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 4.41 \text{ h} \quad V_d = 27.94 \text{ l} \quad Cl_p = 4.38 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al comienzo = 1.06 g/l

Concentración en orina al final = 1.11 g/l

$$C_{m\acute{a}x}/CMI = 10 \quad t_{supra}CMI = 100\%$$

**PACIENTE 7**

➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 24    Peso: 65    Altura: 1.7    Sexo: varón

Diagnóstico: Traumatismo craneal grave y neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: vancomicina, metamizol y propofol

Traumatismo: craneal

Volumen de sustitutos del plasma administrado al paciente: 180 ml/hora (4.3 l/24 horas)

➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

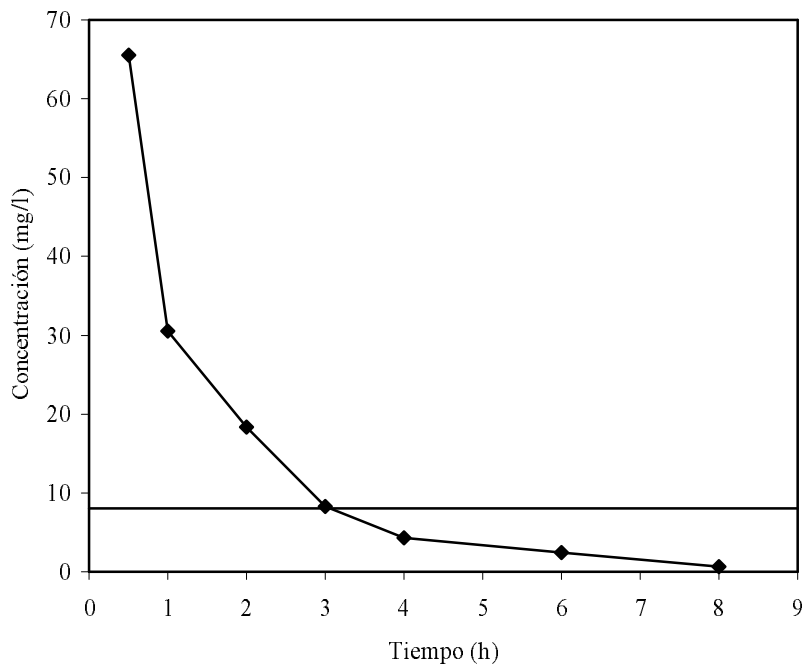


Figura A. 15. Curva de niveles plasmáticos del paciente 7.

➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

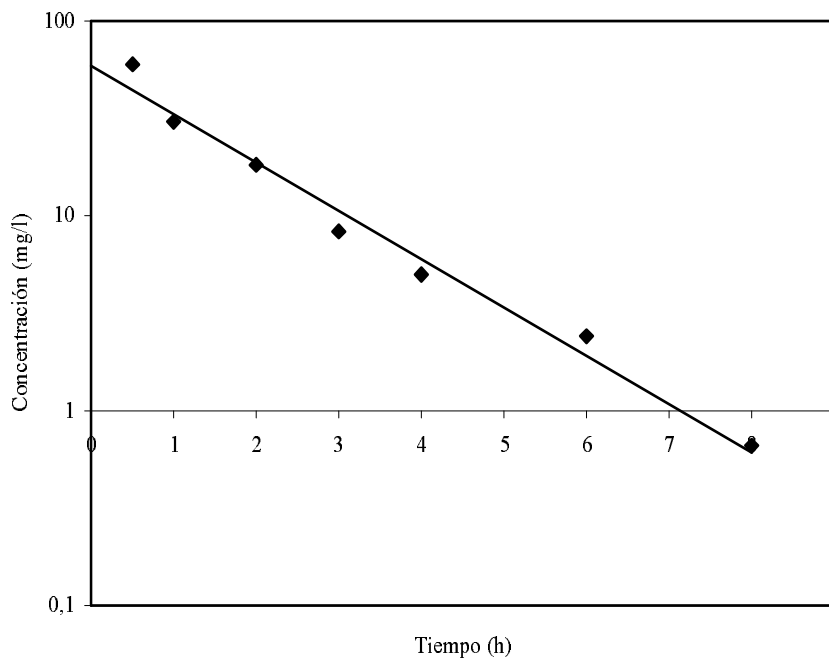


Figura A. 16. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 7.

$$C = 59.19 e^{-0.572 t} \quad k_{el} = 0.572 \text{ h}^{-1}$$
$$C_0 = 59.19 \text{ mg/l} \quad AUC_{\infty}^0 = 130.48 \text{ mg h l}^{-1}$$
$$t_{1/2} = 1.21 \text{ h}$$
$$V_d = 33.79 \text{ l} \quad Cl_p = 19.32 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al comienzo  $\leq$  L.D.

Concentración en orina al final = 69.2 mg/l

$$C_{\text{máx}}/CMI = 8.2 \quad t_{\text{supra}} CMI = 37.5\%$$

## PACIENTE 8

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 35    Peso: 75    Altura: 1.75    Sexo: varón

Diagnóstico: Traumatismo craneal grave y neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: midazolam, vancomicina, amicacina, furosemida y metamizol

Traumatismo: craneal y torácico

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente: 270 ml/hora (7.5 l/24 horas)

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

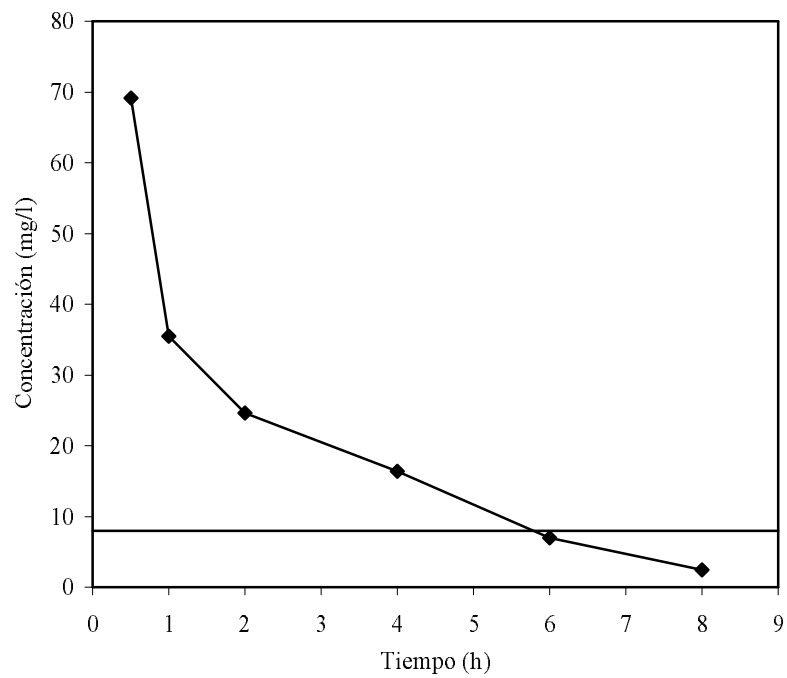


Figura A.17. Curva de niveles plasmáticos del paciente 8

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

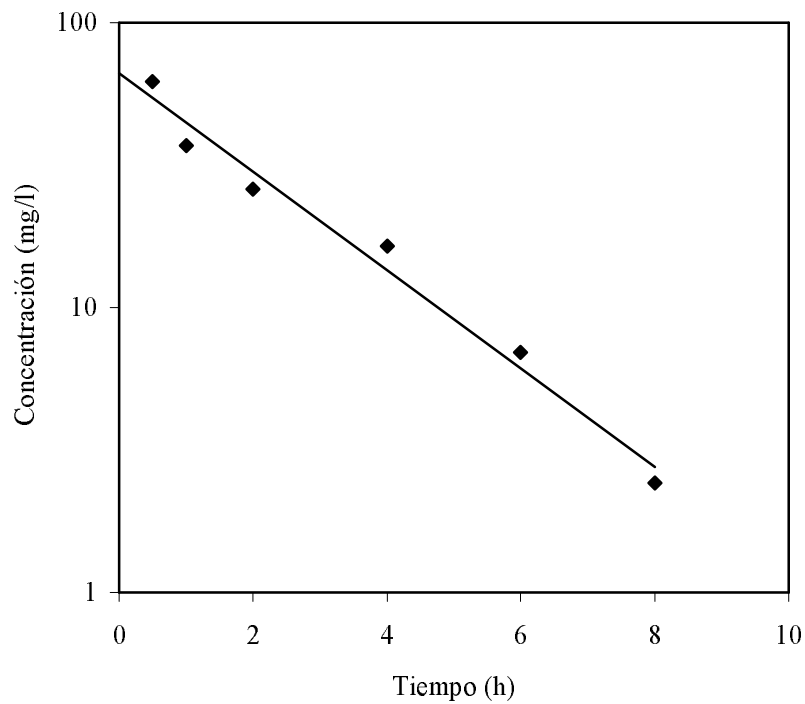


Figura A.18. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 8.

$$\begin{aligned}C &= 66.51 e^{-0.398 t} & k_{el} &= 0.398 \text{ h}^{-1} \\C_0 &= 66.51 \text{ mg/l} & \text{AUC}_o^\infty &= 187.76 \text{ mg h l}^{-1} \\t_{1/2} &= 1.74 \text{ h} & V_d &= 30.07 \text{ l} \\Cl_p &= 11.96 \text{ l/h}\end{aligned}$$

Concentración en orina al comienzo = 250.5 mg/l

Concentración en orina al final = 270.7 mg/l

$$C_{\text{máx}}/\text{CMI} = 8.63 \quad t_{\text{SupraCMI}} = 72.5\%$$

## PACIENTE 9

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 43    Peso: 70    Altura: 1.7    Sexo: varón

Diagnóstico: traumatismo craneoencefálico, neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: vancomicina (1g IV/8h), omeprazol (20 mg IV/12h), metoclopramida (10 mg IV/8h), fenitoina (150 mg IV/8h), cloruro mórfico (perfusión a 0.5 mg/h), metamizol (perfusión 8g/día).

Traumatismo: craneal

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente: ninguno

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

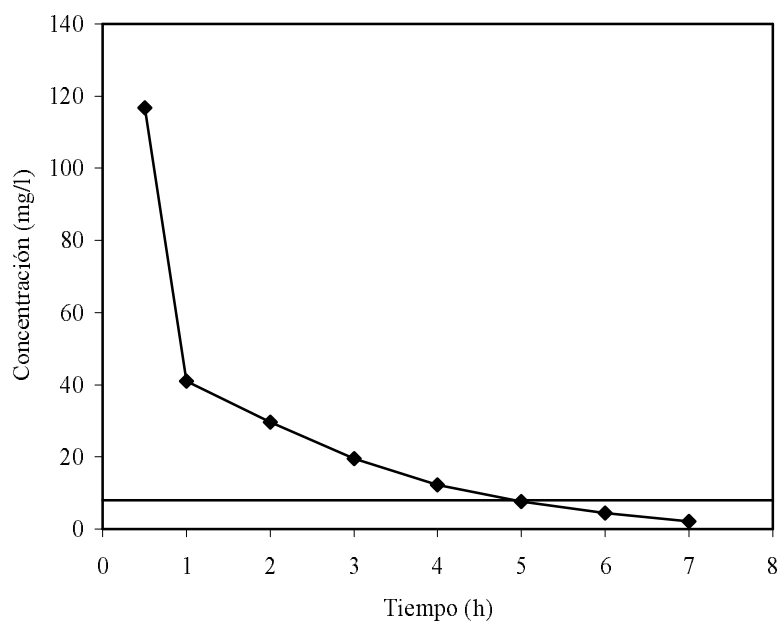


Figura A.19. Curva de niveles plasmáticos del paciente 9.

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

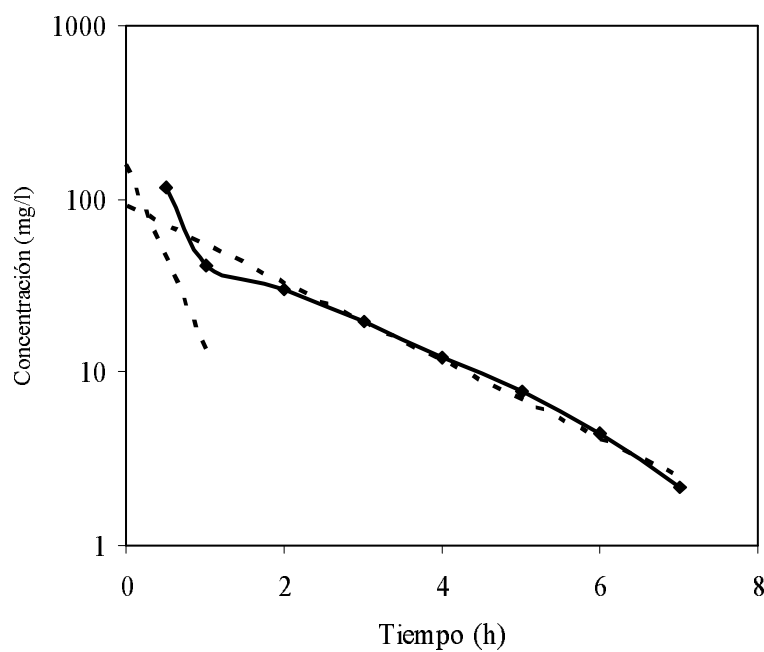


Figura A.20. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 9.

$$C = 156.13 e^{-2.44t} + 91.57 e^{-0.517t}$$

$$C_0 = 247.7 \text{ mg/l}$$

$$\alpha = 2.44 \text{ h}^{-1} \quad \beta = 0.517 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{21} = 1.22 \text{ h}^{-1} \quad K_{el} = 1.027 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{12} = 0.71 \text{ h}^{-1} \quad AUC_{\infty}^o = 250.6 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 1.34 \text{ h} \quad t_{\alpha 1/2} = 0.28 \text{ h}$$

$$V_d = 12.76 \text{ l} \quad Cl = 8.28 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al comienzo = 349.2 mg/l

Concentración en orina al final = 140.4 mg/l

$C_{\text{máx}}/CMI = 20.83$      $t_{\text{supra}}CMI = 62.5\%$

## PACIENTE 10

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 21    Peso: 70    Altura: 1.75    Sexo: varón

Diagnóstico: traumatismo craneoencefálico grave, neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: vancomicina (1g IV/12h), omeprazol (20mg IV/12h), fenitoina (150 mg IV/8h), midazolam (perfusión a 30 mg/h).

Traumatismo: craneal

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente: ninguno

## ➤ CURVA DE NIVELES PLASMÁTICOS

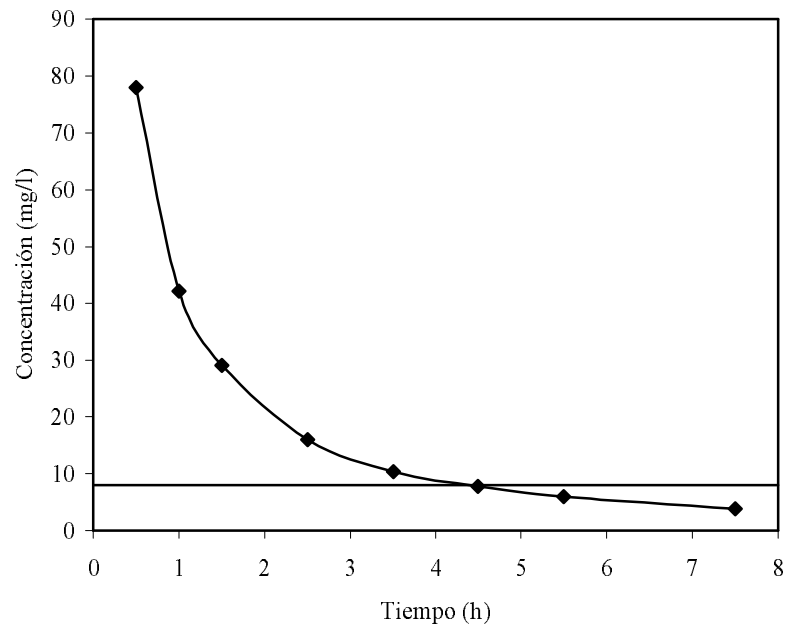


Figura A. 21. Curva de niveles plasmáticos del paciente 10.

NO DETECTADO NIVELES DE CEFEPIMA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

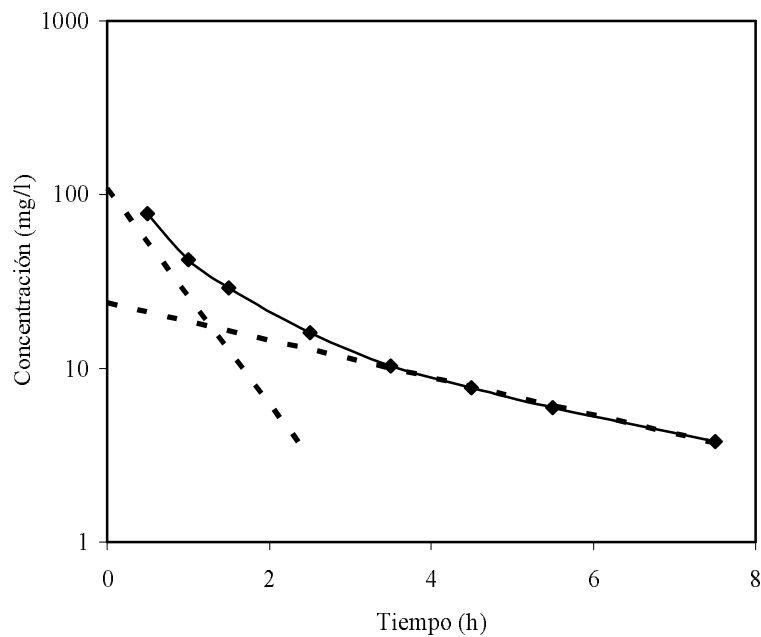


Figura A.22. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 10.



$$C = 107.96 e^{-1.428t} + 23.91 e^{-0.247t}$$

$$C_0 = 131.87 \text{ mg/l} \quad \alpha = 1.428$$

$$\beta = 0.247 \quad k_{21} = 0.461$$

$$K_{el} = 0.765 \text{ h}^{-1} \quad k_{12} = 0.494$$

$$AUC_{\infty}^o = 172.38 \text{ mg h l}^{-1}$$

$$t_{1/2} = 2.8 \text{ h} \quad t_{\alpha 1/2} = 0.48 \text{ h}$$

$$V_d = 31.4 \text{ l} \quad Cl = 11.59 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al comienzo = 699.1 mg/l

Concentración en orina al final = 355.5 mg/l

$$C_{\text{máx}}/CMI = 9.75 \quad t_{\text{supra}} CMI = 52.5\%$$

## PACIENTE 11

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 21    Peso: 85    Altura: 1.8    Sexo: varón

Diagnóstico: traumatismo craneoencefálico grave, trauma raquídeo, neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: teicoplanina (200 mg IV/12h), omeprazol (40 mg IV/24 h), rifampicina (600mg IV/24h), colimicina (2 millones unidades IV/6h), fentanilo (perfusión a 3 microgramos/Kg/h), midazolam (perfusión a 15 mg/h).

Traumatismo: craneal

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente: ninguno

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

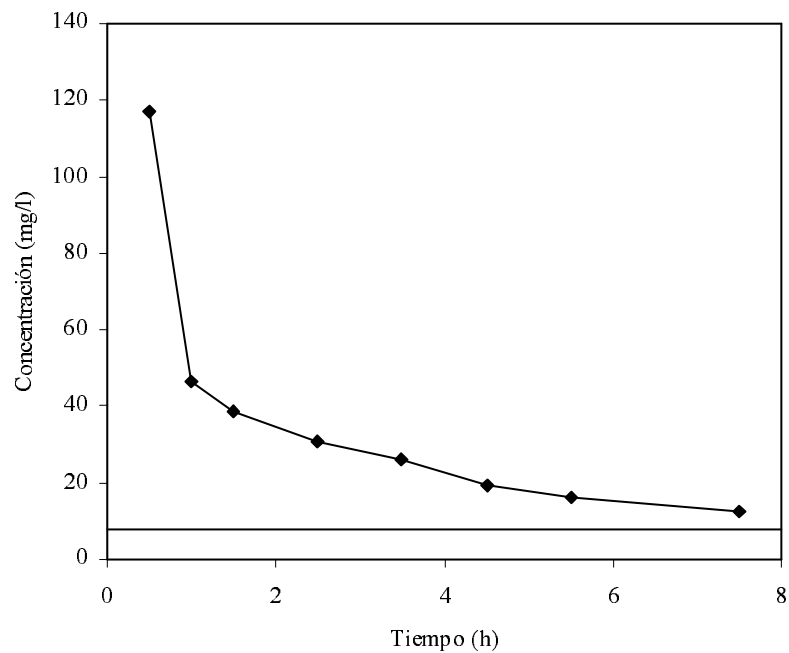


Figura A.23.. Curva de niveles plasmáticos del paciente 11.

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

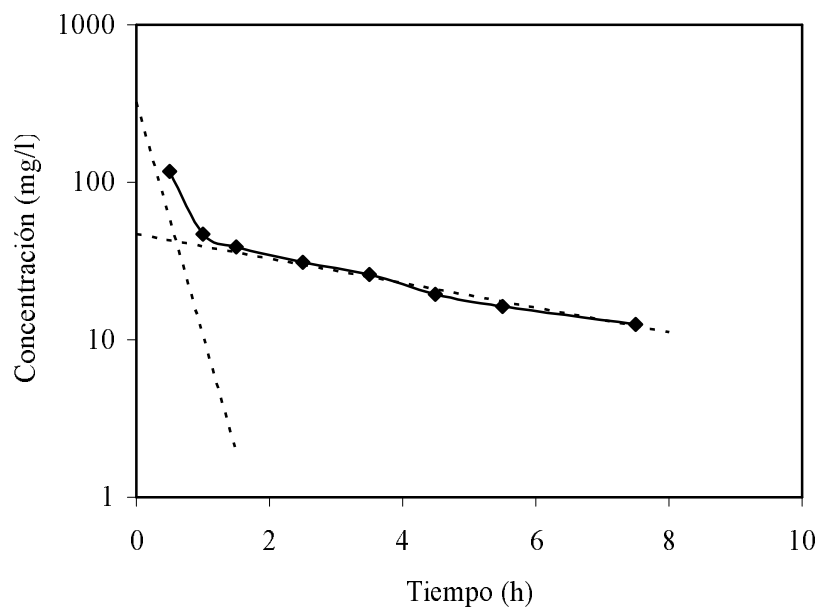


Figura A.24. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 11.

$$C = 322.92 e^{-3.409 t} + 47.96 e^{-0.186 t}$$

$$C_0 = 370.88 \text{ mg/l} \quad \alpha = 3.409$$

$$\beta = 0.186 \quad k_{21} = 0.602$$

$$k_{el} = 1.052 \text{ h}^{-1} \quad k_{12} = 1.945$$

$$AUC_{\infty}^{\circ} = 338.23 \text{ mg h l}^{-1} \quad t_{1/2} = 3.72 \text{ h}$$

$$t_{\alpha 1/2} = 0.2 \text{ h} \quad Vd = 22.8 \text{ l}$$

$$Cl = 5.67 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al comienzo = 104 mg/l

Concentración en orina al final = 1.45 g/l

$$C_{\text{máx}}/CMI = 14.6 \quad t_{\text{supra}}CMI = 100\%$$

## PACIENTE 12

### ➤ DATOS CLÍNICOS

Edad: 51    Peso: 70    Altura: 1.6    Sexo: varón

Diagnóstico: traumatismo craneoencefálico grave, neumonía nosocomial

Dosis administrada: 2 g cada 8 horas

Otros tratamientos: teicoplanina (400 mg IV/12h), omeprazol (40 mg IV/24 h), fenitoina (150 mg IV/8h), furosemida (20 mg IV/8h), ampicilina (1g IV/24h), haloperidol (5mg IV/24h).

Traumatismo: craneal

Otras patologías: alcohólico

Volumen de substitutos del plasma administrado al paciente: ninguno

## ➤ CURVA DE NIVELES PLAMÁTICOS

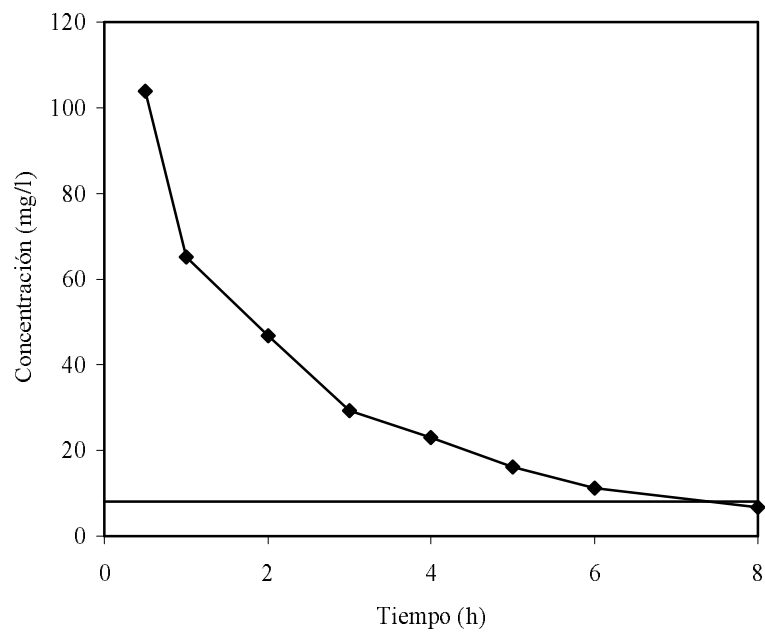


Figura A.25. Curva de niveles plasmáticos del paciente 12.

## ➤ ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y FARMACODINÁMICO

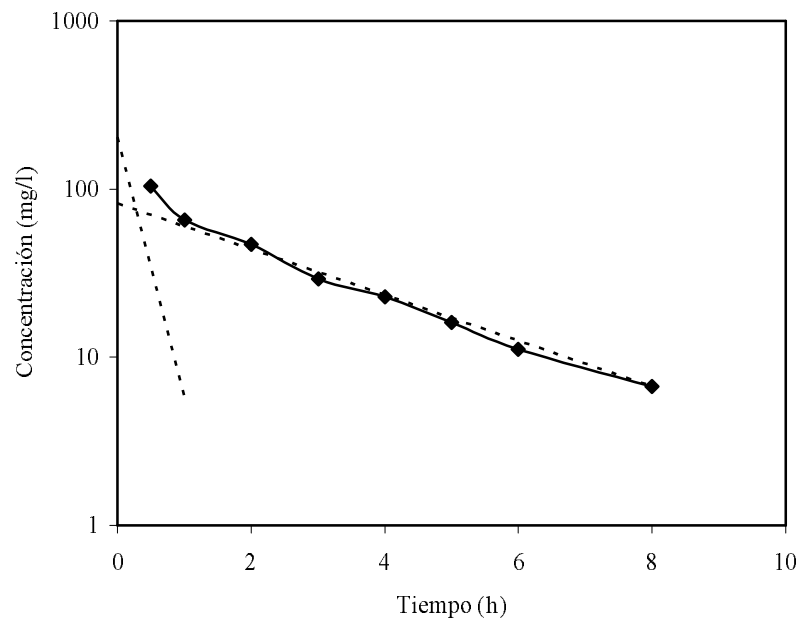


Figura A.26. Representación semilogarítmica de la curva de niveles plasmáticos en el paciente 12.

$$C = 202.44 e^{-3.56 t} + 82 e^{-0.32 t}$$

$$C_0 = 284.44 \text{ ppm} \quad \alpha = 3.56$$

$$\beta = 0.32 \quad k_{21} = 1.25$$

$$k_{el} = 0.9 \text{ h}^{-1} \quad k_{12} = 1.73$$

$$AUC_{\infty}^{\infty} = 311 \text{ mg h l}^{-1} \quad t_{1/2} = 2.16 \text{ h}$$

$$t_{\alpha 1/2} = 0.19 \text{ h} \quad Vd = 16.76 \text{ l}$$

$$Cl = 6.32 \text{ l/h}$$

Concentración en orina al comienzo = 3587.8 mg/l

Concentración en orina al final = 1193.14 mg/l

$$C_{\text{máx}}/CMI = 12.97 \quad t_{\text{supra}}CMI = 94\%$$

A continuación se representa gráficas de comparación de concentraciones plasmáticas de cada grupo de pacientes estudiados (perfundidos con sustitutos de plasma o no perfundidos):

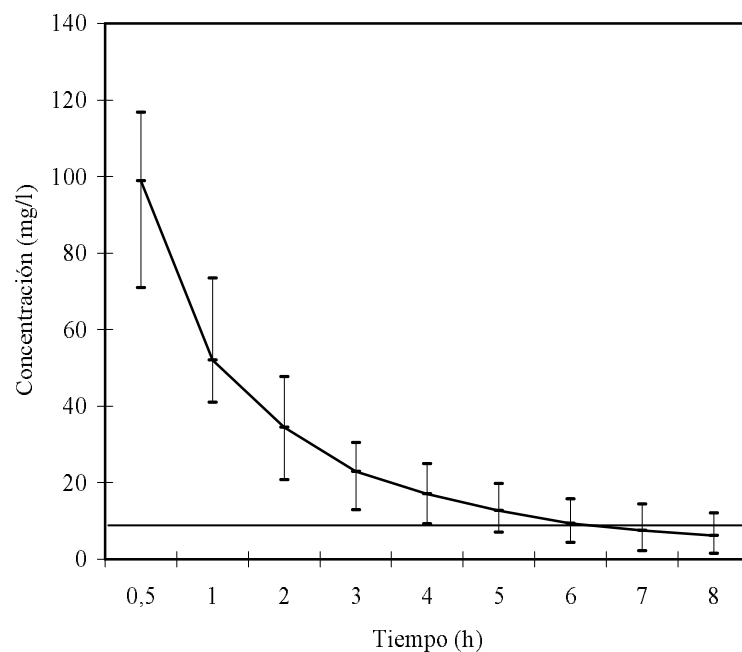


Figura A.27. Comparación de  $C_{\text{plasm}}$  de pacientes no perfundidos con dosis de 2g/8h.

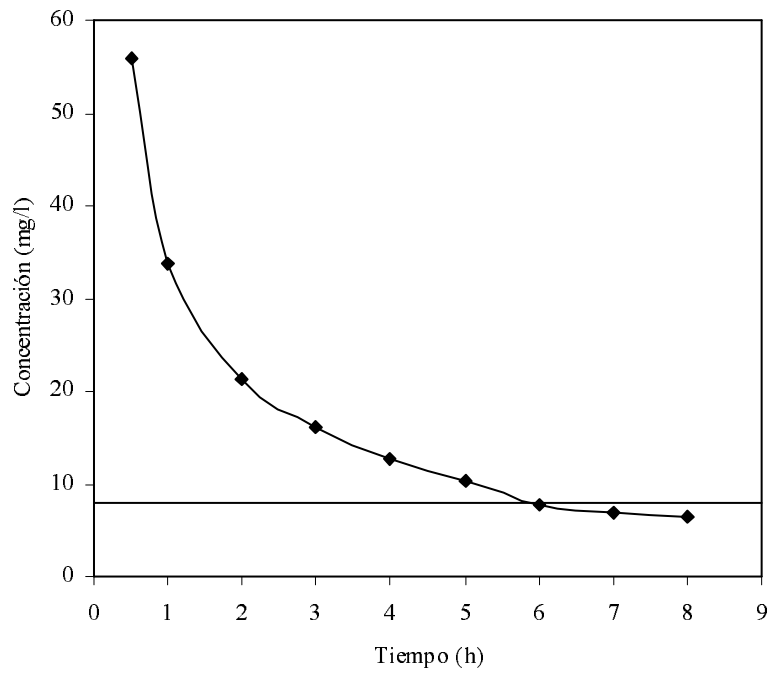


Figura A.28.  $C_{plasm}$  del paciente 3 no perfundido con dosis de 1g/8h.

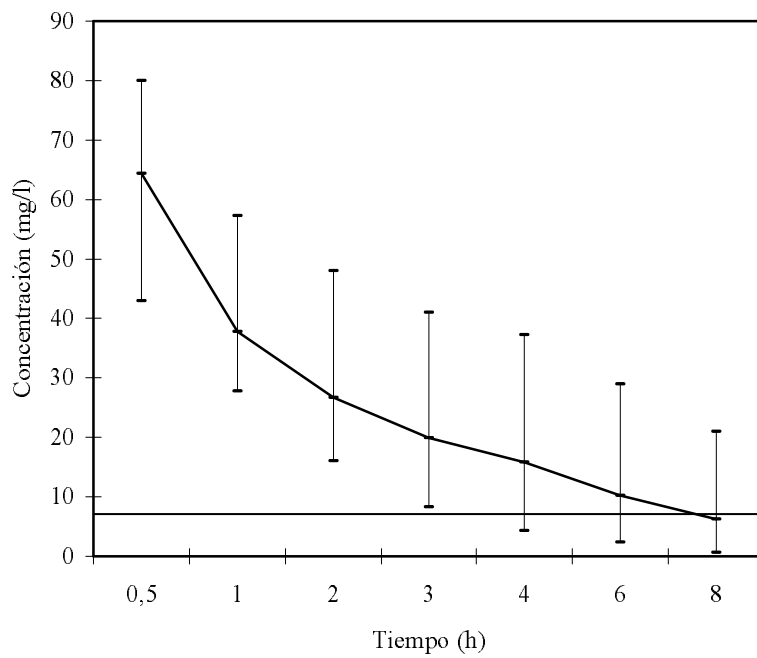


Figura A.29. Comparación de  $C_{plasm}$  de pacientes perfundidos con dosis de 2g/8h.

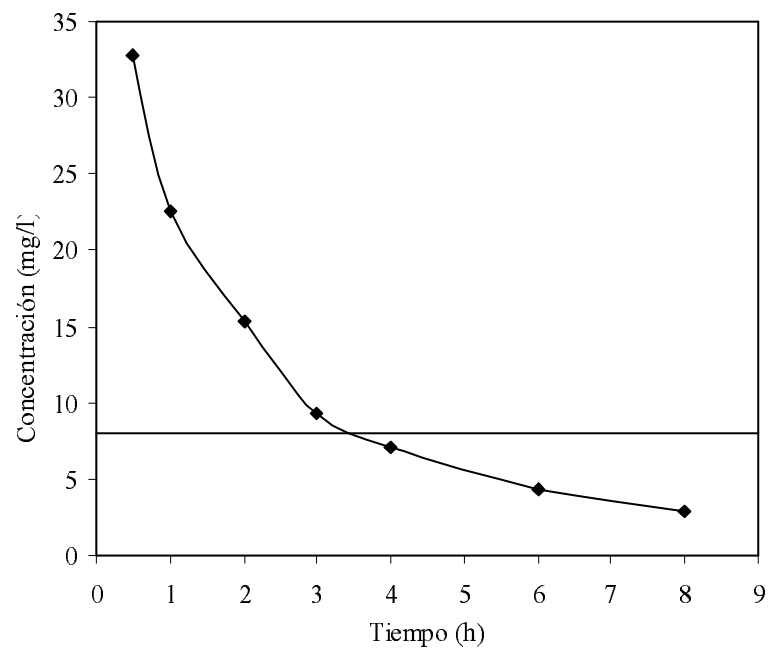


Figura A.30.  $C_{\text{plasm}}$  del paciente 4 perfundido con dosis de 1g/8h.

A continuación se realiza una comparación de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de cada grupo de pacientes.

Tabla A.2. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de pacientes no perfundidos con administración de 2 g de cefepima.

Paciente	C <sub>8</sub> horas (mg/l)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC (mg h l <sup>-1</sup> )	Cl (l/h)	Vd (l)	C <sub>máx</sub> /CMI	t <sub>supra</sub> CMI(%)
1	11.9	6.6	418	4.86	32.3	13.4	100
2	2.3	1.02	183.7	11.05	32.5	8	62.5
9	2.1	1.34	250.6	8.28	12.76	20.8	62.5
10	3.3	2.8	172.4	11.59	31.4	9.7	52.5
11	10.8	3.72	338.2	5.67	22.8	14.6	100
12	6.7	2.16	311	6.32	16.76	13	94
Media±SD	6.2±4.3	2.94±2	279±94.98	7.96±2.84	24.75±8.63	13.2±4.45	78.6±21.7

Tabla A.3. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de pacientes perfundidos con administración de 2 g de cefepima.

Paciente	C <sub>8</sub> horas (mg/l)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC (mg h l <sup>-1</sup> )	Cl (l/h)	Vd (l)	C <sub>máx</sub> /CMI	t <sub>supra</sub> CMI(%)
5	2.5	1.35	100.2	21.27	41.71	5.3	43.7
6	21	4.41	464.7	4.38	27.94	10	100
7	0.7	1.21	130.5	19.32	33.79	8.2	37.5
8	2.4	1.74	187.7	11.96	30.07	8.6	72.5
Media±SD	6.6±9.6	2.17±1.5	220.8±166.6	14.23±7.7	33.37±6	8 ± 1.94	63.4 ± 28.7

Tabla A.4. Parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de pacientes con administración de 1 g de cefepima.

Paciente	C <sub>8</sub> horas (mg/l)	t <sub>1/2</sub> (h)	AUC (mg h l <sup>-1</sup> )	Cl (l/h)	Vd (l)	C <sub>máx</sub> /CMI	t <sub>supra</sub> CMI(%)
3 (no perfundido)	6.5	8.35	233	4.47	38.78	7	75
4 (perfundido)	2.9	1.97	95.7	10.9	31.21	4	42.5



#### A.4.- CONCLUSIONES

Ante los resultados obtenidos se comprueba que la cefepima se ajusta a diferentes modelos farmacocinéticos compartimentales según se trate de pacientes perfundidos o no. En pacientes no perfundidos, la cefepima se ajusta mejor a un modelo farmacocinético bicompartimental; mientras, en pacientes perfundidos se ajusta mejor a un modelo farmacocinético monocompartimental, debido a que en estos pacientes existe una gran eliminación del fármaco debido a las pérdidas de sangre que presentan, lo que provoca un importante efecto de dilución del fármaco. Por ello, las concentraciones plasmáticas de cefepima en pacientes perfundidos son menores que en los no perfundidos, cuando se administra en la misma dosis.

Se observa gran variabilidad de los parámetros farmacocinéticos estudiados entre los distintos pacientes de cada grupo.

Las AUC presentan valores incluidos dentro del intervalo 95.7-464.7 mg h l<sup>-1</sup>.

Los volúmenes de distribución son altos incluso en no perfundidos (>19-22 l en bibliografía).

Los tiempos de semivida son superiores en no perfundidos (3 h) que en perfundidos (2 h) y aumentan con la edad.

No se observa acumulación de cefepima de una dosis a otra.

El aclaramiento en no perfundidos coincide con bibliografía (80-155 ml/min) y en perfundidos poseen valores muy altos.

Las C<sub>plasm</sub> medias al final del intervalo de dosificación se encuentran por debajo de CMI; así, y en no perfundidos es de 6.2 mg/L, y en pacientes perfundidos es de 6.6 mg/L. También en los pacientes 3 y 4, donde se administró 1 gramo de cefepima cada 8 horas, se encontraron concentraciones bajas de 6.5 y 2.9, respectivamente. Estos niveles están por debajo de la CMI<sub>90</sub> de cefepima que es de 8 mg/L, según el Comité Nacional para los Estándares de los Laboratorios Clínicos [188]. Por otro lado, las C<sub>máx</sub>/CMI son

mayores en no perfundidos. Además, las  $t_{\text{supraCMI}}$  media en plasma de los perfundidos no alcanzan el criterio establecido. Así, y tomando el criterio anteriormente comentado de que se considerará que la cefepima tiene una buena actividad si el tiempo de permanencia, en el que la concentración del fármaco en plasma está por encima de 4.3 veces la CMI, es superior al 70% del período interdosis para bacterias Gram negativas, ningún paciente cumple este criterio. La consecuencia de estos niveles tan bajos puede ser importante en una inadecuada acción bactericida o el desarrollo de resistencias.

Por ello, las variables farmacocinéticas fueron usadas para simular regímenes de dosificación alternativos, en un intento de establecer regímenes que mantengan niveles superiores de cefepima al final del periodo de dosificación. Para ello, se usó el programa farmacocinético PharmaCalc para predecir niveles tras 48 horas [189] tras la administración con los regímenes simulados de infusión continua y bolus intravenoso.

Tabla A.5. Simulación de distintos regímenes de dosificación en pacientes no perfundidos.

<b><math>C_{48\text{ h}}</math> (mg/l)</b>				
<b>Paciente</b>	<b>4g/8h<sup>a</sup></b>	<b>2g/5h<sup>a</sup></b>	<b>2g/6h durante 6h<sup>b</sup></b>	<b>2g/8h durante 8h<sup>b</sup></b>
1	91	85	93	70
2	1	2	14	10
9	5	10	48	36
10	20	25	40	30
11	35	55	75	57
12	19	30	60	44
<b>Media <math>\pm</math> SD</b>	<b>28.5 <math>\pm</math> 30.</b>	<b>34.5 <math>\pm</math> 28</b>	<b>55 <math>\pm</math> 25.2</b>	<b>41.2 <math>\pm</math> 19.2</b>

<sup>a</sup> bolus intravenoso

<sup>b</sup> infusión continua

Para estos pacientes y ante los resultados obtenidos, se propone que el régimen de dosificación sea 2 gramos cada 6 horas en infusión continua con una duración de la perfusión de 6 horas ó 2 gramos cada 5 horas en bolus intravenoso.

Tabla A.6. Simulación de distintos regímenes de dosificación en pacientes perfundidos.

<b>C<sub>48 h</sub> (mg/l)</b>				
<b>Paciente</b>	<b>2g/4h<sup>a</sup></b>	<b>4.5g/5h<sup>a</sup></b>	<b>2g/6h durante 6h<sup>b</sup></b>	<b>4g/6h durante 6h<sup>b</sup></b>
5	6	8	13	30
6	80	135	72	110
7	6	7	15	34
8	18	22	25	55
<b>Media ± SD</b>	<b>23 ± 28.9</b>	<b>43 ± 53.4</b>	<b>31.2 ± 24</b>	<b>57.2 ± 32</b>

<sup>a</sup>bolus intravenoso<sup>b</sup>infusión continua

Para estos pacientes y ante los resultados obtenidos, se propone que el régimen de dosificación sea 4 gramos cada 6 horas en infusión continua con una duración de la perfusión de 6 horas.

Tabla A.7. Simulación para los pacientes 3 y 4.

<b>C<sub>48 h</sub> (mg/l)</b>				
<b>Paciente</b>	<b>1g/6h<sup>a</sup></b>	<b>2.5g/12h<sup>a</sup></b>	<b>1g/6h durante 1h<sup>b</sup></b>	<b>1g/6h durante 3h<sup>b</sup></b>
3	40	35	40	45
<b>Paciente</b>	<b>1g/4h<sup>a</sup></b>	<b>1.5g/3h<sup>a</sup></b>	<b>1g/6h durante 6h<sup>b</sup></b>	<b>1.5g/3h durante 3h<sup>b</sup></b>
4	10	25	18	45

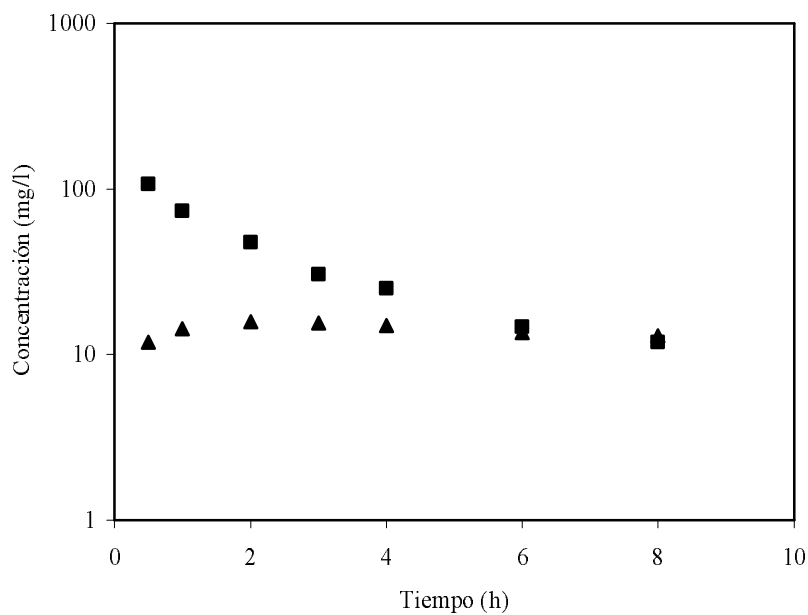
<sup>a</sup>bolus intravenoso<sup>b</sup>infusión continua

Para estos pacientes y ante los resultados obtenidos, se propone que el régimen de dosificación sea 1 gramo cada 6 horas en infusión continua durante un periodo de infusión de 3 horas o un bolus intravenoso de 1 gramo cada 6 horas, para el paciente 3. En relación al paciente 4, se propone que el régimen de dosificación sea 1.5 gramos

cada 3 horas en infusión continua durante un periodo de infusión de 3 horas o un bolus intravenoso de 1.5 gramos cada 3 horas.

**Aún así, y debido a la gran variabilidad de resultados y a las grandes desviaciones obtenidas, se propone que los regímenes de dosificación se realicen de forma individualizada, tras una monitorización de los niveles plasmáticos de la cefepima para cada paciente.**

Por otro lado se estudió la relación entre las concentraciones de cefepima en líquido cefalorraquídeo y las concentraciones en plasma en los distintos pacientes donde se encontró cefepima en líquido cefalorraquídeo.



*Figura A.31.* Curvas semilogarítmicas de concentraciones-tiempo de la cefepima en plasma (■) y en líquido cefalorraquídeo (▲) en el paciente 1.

Tabla A.8. Relación LCR/plasma correspondiente al paciente 1.

Tiempo (h)	Plasma	LCR	Relación LCR/plasma
0.5	107	11.9	0.11
1	73.5	14.3	0.19
2	47.6	15.8	0.33
3	30.5	15.5	0.5
4	25.	15	0.6
6	14.7	13.6	0.92
8	11.9	13	1.09

Como puede observarse la relación entre concentraciones de cefepima en líquido cefalorraquídeo y plasma depende del tiempo en que se toman las muestras, siendo la relación de 0.11 a los 30 minutos, aumentando a 1 a las 8 horas de la administración. Por otro lado el porcentaje de penetración de la cefepima en el líquido cefalorraquídeo es del 14.8%.

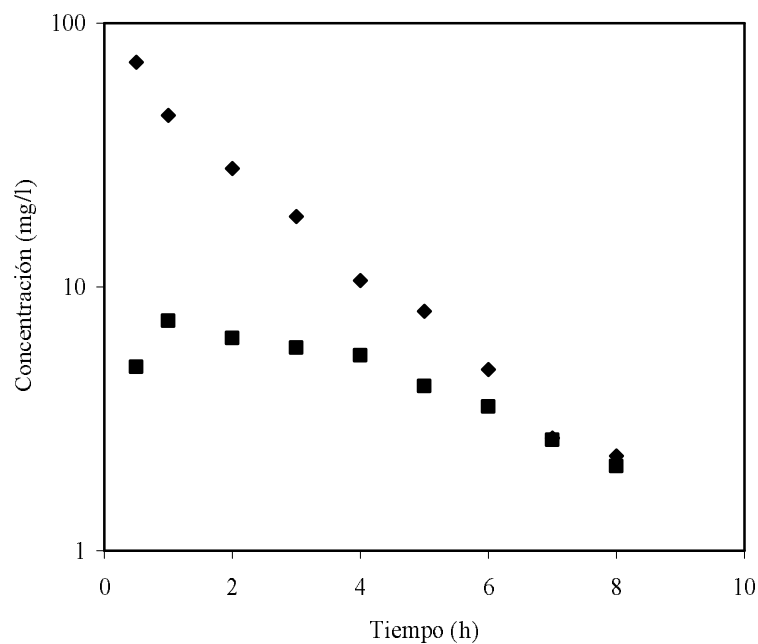


Figura A.32. Curvas semilogarítmicas de concentraciones-tiempo de la cefepima en plasma (◆) y en líquido cefalorraquídeo (■) en el paciente 2.

Tabla A.9. Relación LCR/plasma correspondiente al paciente 2.

Tiempo (h)	Plasma	LCR	Relación LCR/plasma
0.5	70.9	5	0.07
1	44.7	7.4	0.16
2	28.1	6.4	0.22
3	18.5	5.9	0.31
4	10.6	5.5	0.52
5	8.1	4.2	0.52
6	4.8	3.5	0.72
7	2.7	2.6	0.98
8	2.3	2.1	0.91

En este paciente se cumple el comportamiento comentado en el paciente anterior, siendo la relación de 0.07 a los 30 minutos, aumentando a 0.98 a las 7 horas de la administración. Por otro lado el porcentaje de penetración de la cefepima en el líquido cefalorraquídeo es del 10.5%.

En los casos de los pacientes 3 y 4, se comprueba que con dosis de 1 gramo cada 8 horas y en pacientes sin meninges inflamadas, cefepima no alcanza concentraciones en LCR. Lo mismo ocurre en el paciente 10, donde después de la administración de 2 gramos de cefepima en un paciente sin meninges inflamadas, no se encuentran niveles del citado fármaco en LCR.

---

**CONCLUSIONES**

Del estudio realizado sobre la cefepima que se resume en la presente memoria, cabe destacar las siguientes conclusiones:

1. La cefepima es electroactiva en el electrodo de gotas de mercurio, lo que ha permitido su estudio por polarografía diferencial de impulso, *tast* y voltamperometría cíclica. Se ha estudiado la influencia de tiempo de goteo, pH, temperatura, velocidad de barrido, amplitud de impulso y la naturaleza del proceso de reducción, que resulta ser un proceso irreversible.
2. La cefepima presenta dos ondas polarográficas en el rango de pH entre 2 y 4 a potenciales de semionda de -0.48 V (onda I) y -0.84 V (onda II). Solo se estudia la segunda onda ya que presenta unas características más importantes, desde el punto de vista analítico, que la primera onda.
3. El número de protones y electrones que intervienen en el proceso de reducción de la onda estudiada son 2 en ambos casos, y se propone un mecanismo de reducción.
4. Se propone un método polarográfico para la determinación de la cefepima, aplicable a un intervalo comprendido entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M, siendo el límite de detección de  $9 \cdot 10^{-7}$  M y el límite de cuantificación de  $3 \cdot 10^{-6}$  M. El método es bastante selectivo con respecto a otros fármacos, y proporciona buenos resultados en la determinación de cefepima en especialidades farmacéuticas, y en estudios de estabilidad de la misma. El método es aplicado satisfactoriamente a la determinación de la cefepima en muestras de orina y suero correspondientes a pacientes tratados con dicho fármaco.
5. La cefepima se adsorbe en el electrodo de gota de mercurio estática, donde posteriormente puede ser reducida. Se estudia el comportamiento electroquímico de la cefepima mediante voltamperometría de redisolución adsorptiva catódica de barrido lineal, estudiando la influencia del pH sobre el potencial y la intensidad de pico, la temperatura, el potencial de acumulación, el tiempo de deposición y la velocidad de barrido.



6. Se propone un método voltamperométrico para la determinación de la cefepima, aplicable a un intervalo comprendido entre  $10^{-9}$  y  $10^{-7}$  M, siendo el límite de detección de  $4.8 \cdot 10^{-10}$  M y el límite de cuantificación de  $1.6 \cdot 10^{-9}$  M. El método es aplicado satisfactoriamente a la determinación de la cefepima en muestras de orina y líquido cefalorraquídeo correspondientes a pacientes tratados con dicho fármaco.
7. Se estudian las características espectrofotométricas de la cefepima, incluyendo la influencia de disolventes orgánicos y la estabilidad de los mismos, influencia de agentes rédox e iones inorgánicos, e influencia del pH.
8. Los datos espectrofotométricos en relación al pH, junto con la valoración potenciométrica de la cefepima, fueron empleados para la determinación del pKa de la misma, que tiene un valor de 3.
9. Se propone un método espectrofotométrico para la determinación de la cefepima, aplicable a un intervalo comprendido entre 1 y 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , siendo el límite de detección de 0.31  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y el límite de cuantificación de 1.04  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . El método es aplicado satisfactoriamente a la determinación de la cefepima en especialidades farmacéuticas.
10. Se propone un método de análisis de la cefepima por cromatografía líquida de alta eficacia de gran sensibilidad, utilizando una fase móvil compuesta por metanol:tampón fosfato a pH 7 en la proporción 25:75. El método es aplicable a intervalos comprendidos entre 2.5 y 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para un flujo de 1 ml/min y de 2.5-50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para un flujo de 0,5 ml/min. Los límites de detección son de 0.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y 0.08  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para los flujos de 1 ml/min y 0,5 ml/min, respectivamente. Los límites de cuantificación son de 0.3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y 0.24  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para los flujos de 1 ml/min y 0,5 ml/min, respectivamente. El método es aplicado satisfactoriamente a la determinación de la cefepima en muestras de orina, suero y líquido cefalorraquídeo correspondientes a pacientes tratados con dicho fármaco.

11. Los datos analíticos obtenidos en la determinación de cefepima en fluidos biológicos correspondientes a pacientes tratados con dicho fármaco, se utilizaron para realizar un estudio farmacocinético y farmacodinámico. Con los resultados obtenidos se propone un ajuste de dosis mediante simulación.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Brotzu, G. Ricerche su di un nuova antibiotico. Lavori dell' Instituto d' Igiere di Cagliari. 1-11, 1948.
2. Burton, H.S.; Abraham, E.P. Isolation of antibiotic from a species of cephalosporium. *Biochem. J.* 50, 168, 1951.
3. Newton, G.G.F.; Abraham, E.P. Degradation, structure and some derivates of cephalosporin N. *Biochem. J.* 58, 103, 1954.
4. Newton, G.G.F.; Abraham, E.P. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- $\alpha$ -aminoadipic acid. *Nature.* 175, 548, 1955.
5. Newton, G.G.F.; Abraham, E.P. Structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* 79, 377, 1961.
6. O'Callaghan, C.H. Classification of cephalosporins by their antibacterial activity and pharmacokinetic properties. *J. Antimicrob. Chemother.* 1, 1-12, 1975.
7. Neu, H.C. Structure-activity relations of new beta-lactam compounds and in vitro activity against common bacteria. *Rev. Infect Dis.* 5, S319-S337, 1983.
8. Neu, H.C. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am. J. Med.* 79, 2-13, 1985.
9. Neu, H.C. Antibacterial activity of desacetylcefotaxime alone and in combination with cefotaxime. *Rev. Infec. Dis.* 4, S374-378, 1978.
10. Hyneck N.L.; Berardi R.R.; Johnson R.M. Interference of cephalosporins and cefoxitin with serum creatinine determination. *Am. J. Hosp. Pharm.* 38, 1348-1352, 1981.
11. Ohya, S.; Yamasaki, M.; Sugamara, S. Effect of 7 alfa substitution of cephems on their betalactamase stability and affinity for penicillin-binding proteins in *Morgarella Morganii*. *Antimicrob Agent Chemother.* 23, 522-525, 1983.
12. Patel, I.H.; Kaplan S.A. Pharmacokinetic profile of ceftriazone in humans. *Am. J. Med.* 77, 17-25, 1984.
13. Sattelr, F.R.; Weitekamp, M.R.; Ballard, J.O. Potential for bleeding with new betalactam antibiotics. *Ann. Intern. Med.* 105, 924-931, 1986.
14. Stapley, E.O.; Birnbaum, J. Chemistry and microbiological properties of the cephamycins. *Betalactam antibiotics.* Academic Press, New York. 327-351, 1981.
15. O'Callaghan, C.H.; Spikes, R.B.; Griffith, A. Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic: Activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 9, 511-519, 1976.
16. Neu, H.C. Factors that effect the in vitro activity of cephalosporin antibiotics. *J. Antimicrob Chemother.* 10, 11-23, 1982.

17. Curtis, N.A.C.; Orr, D.; Ross, G.W.; Boulton, M.G. Affinities of penicillins and cephalosporins for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12 and their antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 16, 533-539, 1979.
18. Spratt, B.G.; District penicillin-binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2999-3005, 1975.
19. Levy, S. Resistencia microbiana a los antibioticos. Un problema cambiante y persistente. *The Lancet.* 2, 83-88. 1982.
20. Gutmann, L.; Williamson, R.; Collatz, E. The possible role of porins in antibiotic resistance. *Ann. Intern. Med.* 101, 544-557, 1984.
21. Nikaido, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 33, 1831-1836, 1989.
22. Brow, D.F.J.; Reynolds, P.E. Intrinsic resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* 122, 275-278, 1980.
23. Hartman, B.J.; Tomasz, A. Low affinity penicillin binding proteins associated with  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158, 513-516, 1984.
24. Hedge, P.J.; Spratt, B.G. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics by re-modelling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. *Nature.* 318, 1-5, 1985.
25. Ubukata, K.; Yamashita, N.; Konno, M. Occurrence of a  $\beta$ -lactam inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 27, 851-857, 1985.
26. Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39, 1211-1233, 1995.
27. Richmond, M.H.; Sykes, R.B. The  $\beta$ -lactamases of gramnegative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microbiol. Physiol.* 9, 31-88, 1973.
28. Ambler, R.P. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond.* 289, 321-331, 1980.
29. Brogard, J.M.; Conte, F. Pharmacokinetics of the new cephalosporins. *Antibiot Chemother.* 31, 145-210, 1982.
30. Bergan, T. Pharmacokinetic properties of the cephalosporins. The cephalosporins antibiotics. *Adis Press, Duckland.* 89-104, 1987.

31. Saxon, A.; Bell, G.N.; Rohry, A.S.; Adelman, D. Immediate hiper-sensitivity reaction to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Annals Internal Med.* 107, 204-215, 1987.
32. Karchmer, A.W. *Cephalosporins. Principles and practice of infectious diseases.* Churchill Livingstone, New York. 1995.
33. Weck, A.L.; Schneider, C.H. Allergic and immunological aspects of therapy with cefotaxime and other cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 6, 161-168, 1980.
34. Oberholtzer, E.R.; Brenner, G.S. Cefoxitin sodium: solution and solid-state chemical stability studies. *J. Pharm. Sci.* 68, 863-866, 1979.
35. Yamana, T.; Tsuji, A. Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution: kinetics and mechanisms of degradation. *J. Pharm. Sci.* 65, 1563-1574, 1976.
36. Fabre, H.; Eddine, N.H.; Berge, G. Degradation kinetics in aqueous solution of cefotaxime sodium, a third-generation cephalosporins. *J. Pharm. Sci.* 73, 611-618, 1984.
37. *Catálogo de Especialidades Farmacéuticas.* Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Madrid. 2001.
38. Griffith, R.S.; Black, H.R. Cephalothin. A new antibiotic. *JAMA.* 189, 823-828, 1964.
39. Torck, M.; Anderson, K.N.; Smith, R.H. Laboratory and clinical evaluation of a new antibiotic: cephalothin. *Ann Intern Med.* 63, 199-211, 1965.
40. Weinstein, L.; Kaplan, K.; Chang, T.W. Treatment of infections in man with cephalothin. *JAMA.* 189, 829-832, 1964.
41. Antimicrobial prophylaxis in surgery. *Med. Letter.* 25, 113-116, 1983.
42. Birnbaum, J.; Stapley, E.D.; Miller, A.K. Cefoxitin, semisynthetic cephamycin: a microbiologic overview. *J. Antimicrob. Chemother.* 4, 15-32, 1978.
43. Vianna, N.J.; Kaye, D. Penetration of cephalothin into spinal fluid. *Am. J. Med. Sci.* 254, 216-220, 1967.
44. Ball, A.P.; Brookes, G.P.; Farrell, I.D. Studies with cefuroxime: a new betalactamase resistant cephalosporin. *Chemother.* 25, 214-221, 1979.
45. Hanninen, P.; Saarimasa H.; Clinical profile of cefuroxime in 64. *Proc. R Soc. Med.* 70, 111-117, 1977.
46. Barrier, S.L.; Hatheway, G.J. Pharmacokinetics of cefonicid. A new broad spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 21, 935-938, 1982.

47. Bergan, T. Pharmacokinetic properties of the cephalosporin. *Drugs*. 34(Suppl. 2), 89, 1987.
48. Norrby, S.R. Role of the cephalosporin in the treatment of bacterial meningitis in adults. *Am. J. Med.* 79 (Suppl. 20), 56, 1985.
49. Cunha, B.A. Third-generation cephalosporin: a review. *Clin. Ther.* 14, 616, 1992.
50. Neu, H.C. the pharmacokinetic of the cephalosporin: significance in clinical practice. *Bull NY Acad. Med.* 60. 327, 1984.
51. Thronsberry, C. Review of in vitro activity of third-generation cephalosporins and other new betalactam antibiotic against clinical important bacteria. *Am. J. Med.* 79, 14, 1985.
52. Neu, H.C. Cephalosporin in the treatment of meningitis. *Drugs*. 34, 135, 1987.
53. Grassi, G.G.; Grassi, C. Cefepime: overview of activity in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 32 (Suppl. B), 87, 1993.
54. Vaque, J.; Roselló, J. Evolución de la prevalencia de las infecciones nosocomiales en los hospitales españoles. Proyecto EPINE 1990-1999. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene (SEMPSPH). 2001.
55. Neu, H.C. Relationship of the structural properties of the betalactam antibiotics with the antibacterial activity. *Am. J. Med.* 79 (Suppl. 2<sup>a</sup>), 2-13, 1985.
56. Price, K.E.; McGregor, D.N. Basic design of the betalactam antibiotics- cephalosporins. *Scand J. Infect. Dis. (Suppl. 42)*, 50-63. 1984
57. Neu, H.C. Rev. Structural relationships of the betalactam antibiotics that affect the activity in vitro and the pharmacological properties. *Infect. Dis.* 8 (Suppl. 3), 237-259, 1986.
58. Uri, J.V.; Bardash, N.; Bendas, C.M. The antibiotics aminothiazolyl-oxyimino cephalosporins with substitutions of quaternary ammonium in in the position 3. *Acta Microb. Hung.* 35, 327-356, 1988.
59. Honorato, J.; Simón, M.; Zamarreño, A.M. Perfil farmacocinético de cefepima. *Rev. Esp. Quimioterap.* 9, 19-23, 1996.
60. Bellido, F.; Pechere, J-C.; Hancock, R.E.W. Reevaluation of the factors implicate in the efficiency of new betalactam agents as compared to Enterobacter cloacae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 73-78, 1991.
61. Sanders, C. Betalactamases of bacteria gram-negative; new challenges for new drugs. *Clinical Infectious Diseases.* 14, 1089-1099, 1992.

62. Nikaido, H.; Liu, W.; Rosenberg, E. Permeability of the external membrane and stability to the betalactamase of ionics cephalosporins that contain methoxyimino substitution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 337-342, 1990.
63. Bellido, F.; Pechere, J-C.; Hancock, R.E.W. New method to measure the permeability of the external membrane of new betalactam in the intact cells of Enterobacter cloacae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 35-68, 1991.
64. García Rodríguez, J.A. cefepima, paradigma de las cefalosporinas de cuarta generación. *Rev. Esp. Quimioterap.* 10, 3-6, 1997.
65. Hancock, R.E.W.; Bellido, F. Factors implicate in the greater efficiency against bacteria gram-negative, of the fourth generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 29 (Suppl. A), 1-6, 1992.
66. Perea, E.J.; Martínez-Martínez, L. Actividad de cefepima frente a enterobacterias productoras de betalactamasas. *Rev. Esp. Quimioterap.* 10, 19-24, 1997.
67. Jacoby, G.A.; Carreras, J. Activities of  $\beta$ -lactam antibiotics against Escherichia coli stains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamaese. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 858-862, 1990.
68. Pucci, M.J.; Boice-Sowek, J.; Kessler, R.E. Comparison of the conjugate affinities of cefepime, cefpirome and cefacidin for conjugate proteins of penicillin in E. coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2312-2317, 1991.
69. Neu, H.C.; Chin, N.X.; Jules, K.; Labthavikul, P. Activity of BMY-28142, new cephalosporins of broad spectrum, stable to the betalactamase. *J. Antimicrob. Chemother.* 17, 441-452, 1986.
70. Sanders C.C.; Sanders, W.E. Microbian resistance to betalactam antibiotics of recent generation; clinic and laboratory implications. *J. Infect. Dis.* 151, 399-406, 1985.
71. Kessler, R.E.; Fung-Tomc, J. Susceptibility of bacterial isolates to  $\beta$ -lactam antibiotics from U.S. Clinical trials over a 5-year period. *The American Journal of Medicine.* 100, 14-19, 1996.
72. Sanders C.C.; Sanders, W.E. Betalactamasas of type I, of bacteria gram - negative, interactions with betalactan antibodies. *J. Infect. Dis.* 154, 792-800, 1986.
73. Pechere, J-C. Resistance development during the treatment of gram-negative infections with betalactan agents. *Drugs.* 35 (Suppl. 2), 22-28, 1988.



74. Vuye, A.; Pijck, J. Antibacterial activity in vitro of BMY-28142, a new cephalosporin of broad spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 574-577, 1985.
75. Barbhaiya, R.H.; Fogue, S.T.; Cleason, C.R. Evaluation of the innocuousness, tolerance and pharmacokinetic of cefepime after the administration of individual intravenous dose. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1118-1122, 1990.
76. Barbhaiya, R.H.; Knupp, C.A.; Tenney, J. Innocuousness, tolerance and pharmacokinetic of cefepime administered by intramuscular tract to healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 30, 900-910, 1990.
77. Okamoto, H.P.; Nakairo, R.K.; Chin, A. Cefepime clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 25, 88-102, 1993.
78. Barbhaiya, R.H.; Knupp, C.A.; Fogue, S.T. Disposition of the cephalosporins cefepime in normal and renally impaired subjects. *Drugs Metabolism. Disposition.* 19, 68-73, 1991.
79. Candha, D.; Wise, R.; Baldwin, D.R. Concentrations of cefepime in the mucous bronchial and in plasma after an alone intravenous dose of 2 grams. *J. Antimicrob. Chemother.* 25, 959-963, 1990.
80. Barrier, S.L. The pharmacokinetic characteristics of cefepima. *Am. J. Med.* Inédito.
81. Fogue, S.T.; Guay, D.R.P.; Morgenthien, F.A. Farmacocinética de cefepima en pacientes con trastorno renal. Resumen presentado a la Conferencia Interscience 30 de Agentes Antimicrobianos y Quimioterapia. Atlanta. Octubre 1990.
82. Moday, J. *Journal of Chemotherapy.* 8, 88, 1996.
83. Ozdamar, A.; Aras, C.; Ozturk, R.; Karacorlu, M.; Bahcecioglu, H.; Ozkan, S. Ocular penetration of cefepima following systemic administration in humans. *Ophthalmic Surg Laser.* 32, 25-29, 2001.
84. Aras, C.; Ozdamar, A.; Ozturk, R.; Karacorlu, M.; Ozkan, S. Intravitreal penetration of cefepima after systemic administration to humans. *Ophthalmologica.* 216, 261-264, 2002.
85. Cronquist, J.; Nilsson-Ehle, Y.; Öquist, B. Pharmacokinetics of cefepime dihydrochloride arginine in subjects with renal impairment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2676-2680, 1992.
86. Barbhaiya, R.H.; Knupp, C.A.; Fogue, S.T. Pharmacokinetic of cefepime in subject with renal insufficiency. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48, 268-276, 1990.

87. Barbhaiya, R.H.; Knupp, L.A.; Pittman, K.A. Effects of age and gender on pharmacokinetics of cefepime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1181-1185, 1992.
88. Bacher, K.; Schaeffer, F.; Lode, H. Multiple dose pharmacokinetics, safety and effects on fecal microflora of cefepime in healthy volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 30, 365-375, 1992.
89. Baucaire, G.; Nicolas, M.H.; Martín, C.; Offenstadt, G.; Philippon, A.; Holzapfel, L. Comparative study of combined cefepime-amikacin versus ceftazidime combined with amikacin in treatment of nosocomial pneumonias in ventilated patients. Multicenter group study. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 18, 186-195, 1999.
90. Ambrose, P.G.; Richerson, M.A.; Stanton, M.E.; Bui, K.; Nicolau, D.P.; Nightingale, C.H.; Quintilliani, R. Cost-effectiveness analysis of cefepime compared with ceftazidime in intensive care unit patients with hospital-acquired pneumonia. *Infect. Dis. Clin. Pract.* 8, 246-251, 1999.
91. Zervos, M.; Nelson, M. Cefepime versus ceftriaxone for empiric treatment of hospitalized patients with community acquired pneumonia. The cefepime study group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 729-733, 1998.
92. Brun-Buisson, C.; Doyon, F.; Carlet, J.; and the French Bacteremia-sepsis study group. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in UCIs and wards of 24 hospitals. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 154, 617-624, 1996.
93. Ramphal, R. Is monotherapy for febrile neutropenia still a viable alternative?. *Clin. Infect. Dis.* 29, 508-514, 1999.
94. Biron, P.; Fuhrmann, C.; Cue, H.; Viens, P.; Lefebvre, D.; Thyss, A. Cefepime versus imipenem-cilastatin as empirical monotherapy in 400 febrile patients with short duration neutropenia. CEMIC Study Group of Infectious Diseases in Cancer. *J. Antimicrob Chemother.* 42, 511-518, 1998.
95. Wang, F.D.; Liu, C.Y.; Hsu, H.C.; Gaa, J.P.; Chau, W.K.; Haung, M.L.; Ho, C.H. A comparative study of cefepime versus ceftazidime as empiric therapy of febrile episodes in neutropenic patients. *Chemotherapy.* 45, 370-379, 1999.
96. Jones, R.N.; Kugler, K.C.; Pfaller, M.A.; Winokur, P.L.; Characteristics of pathogens causing urinary tract infections in hospitals in North America: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 55-63, 1999.

97. Arkell, D.; Ashrap, M.; Andrews, J.M.; Wise, R. An evaluation of the penetration of cefepime into prostate tissue in patients undergoing elective prostatectomy. *J. Antimicrob. Chemother.* 29, 473-474, 1992.
98. Gentry, L.O.; Rodríguez Gómez, G. Randomized comparison of cefepime and ceftazidime for the treatment of skin, surgical wound and complicated urinary tract infections in hospitalized subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 35, 2371-2374, 1991.
99. Barie, P.S.; Vogel, S.B.; Dellinger, E.P.; Rotstein, O.D.; Solomkin, J.S.; Yang, J.Y.; Baunmgartner, T.F. A randomized, double-blind clinical trial comparing cefepime plus metronidazole with imipipenem-cilastatin in the treatment of complicated intra-abdominal infections. Cefepime Intra-abdominal Infection Study Group. *Arch. Surg.* 132, 1294-1302, 1997.
100. Li, P.K.; Ip, M.; Law, M.C.; Szeto, C.C.; Leung, C.B.; Wong, T.Y. Use of intraperitoneal cefepime as monotherapy in treatment of CAPD peritonitis. *Perit. Dial. Int.* 20, 232-234, 2000.
101. Cainzos, M. Cefepima en el tratamiento de las infecciones biliares. *Rev. Esp. Quimioterap.* 9 (Supl. 1), 67, 1996.
102. Saez-Llorens, X.; Castaño, E, García, R.; Baez, C.; Pérez, M.; Tejeira, F.; McCracken, G.H. Prospective randomized comparison of cefepime and cefotaxime for treatment of bacterial meningitis in infants and children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 937-940, 1995.
103. Livermone, D.M. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Scand J. Infect Dis.* 78, 7-16, 1991.
104. Vicent, J.L.; Bihari, D.J.; Suter, P.M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive care (EPIC) Study. *JAMA.* 274, 639-644, 1995.
105. Alvarez Lerma, F. Tratamiento de las infecciones graves en el paciente crítico ingresado en UCI. Utilidad de cefepima. *Rev. Esp. Quimioterapia.* 10, 33-43, 1997.
106. Bodnar, J.E.; Evans, W.G.; Mays, D.L. Spectrophotometric determination of cephalpirin, a cephalosporin antibacterial. *J. Pharm. Sci.* 68, 1108-1111, 1997.
107. Ayad, M; Shalaby, A.; Abdellatef, H; Elsaid, H. Spectrophotometric determination of certain cephalosporins through oxidation with cerium (IV) and 1-chlorobenzotriazole. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 557-564, 1999.

108. Ayad, M.; Shalaby, A.; Abdellatef, H.; Elsaid, H. Spectrophotometric and atomic absorption spectrometric determination of certain cephalosporins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18, 975-983, 1999.
109. El-Walily, A.; Gazy, A.; Belal, S.; Khamis, E. Quantitative determination of some thiazole cephalosporins through complexation with palladium (II) chloride. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22, 385-392, 2000.
110. Al-Momani, I.F. Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25, 751-757, 2001.
111. El-Gindy, A.; El Walily, A.F.; Bedair, M.F. First-derivate spectrophotometric and LC determination of cefuroxime and cefadroxil in urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 341-352, 2000.
112. Morelli, B. First and second derivate spectrophotometric assay of mixture of cefuroxime and cephalexin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6, 199-209, 1988.
113. Morelli, B. Derivate spectrophotometry in the analysis of mixtures of cefotaxime sodium and cefadroxil monohydrate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22, 257-267, 2003.
114. Zuman, P.; Kapetanovic, V.; Aleksic, M. Recent developments in electroanalytical chemistry of cephalosporins and cefamycins. *Analytical letters.* 33, 2821-2857, 2000.
115. Foog, A.G.; Fayad, N.M. Differential pulse polarographic determination of cephalosporins and their degradation products. *Anal. Chim. Acta.* 108, 205-211, 1979.
116. Muñoz, E.; Camacho, L.; Avila, J.L.; García-Blanco, F. Electrochemical reduction of cefsulodin. *Analyst.* 113, 23-25, 1988.
117. Sengün, F.; Gürkan, T.; Fedai, I.; Sungur, S. Polarographic behavior of some cephalosporins and assay of their formulations. *Analyst.* 110, 1111-1115, 1985.
118. Reddy, G.V.; Reddy, S. Estimation of cephalosporin antibiotics by differential pulse polarographic. *Talanta.* 44, 627-631, 1997.
119. Ogorevc, B.; Hudnik, V.; Gomiscec, S. Polarographic analysis of some cephalosporin antibiotics. *Fresenius Anal. Chem.* 330, 59-64, 1988.
120. Kapetanovic, V.; Aleksic, M.; Erceg, M.; Veselinovic, D. Electrochemical study of cefetamet and its polarographic determination. *Il Farmaco.* 55, 13-20, 2000.

121. Prasad, B.; Gupta, S. Indirect measurement of cephalosporins and penicillins by differential pulse adsorptive stripping voltammetry at mercury electrode. *Acta Pharm.* 50, 83-92, 2000.
122. Ali, A.; El-Maali, N.; Ghandour, M. Determination of cefobid using adsorptive stripping voltammetric technique in different media. *Electroanalysis.* 5, 85-89, 1993.
123. Ogorevc, B.; Krasna, A.; Hudnik, V.; Gomiscek, S. Adsorptive stripping voltammetry of selected cephalosporin antibiotics and their direct determination in urine. *Mikrochim. Acta.* I, 131-144, 1991.
124. Rovan, M.C.; Abadie, F.; Leclerc, A.; Juge, F. Systematic approach to the determination of cephalosporins in biological fluid by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 275, 133-144, 1983.
125. Van de Venne, J.; Hendrikx, H.; Deelder, R. Retention behaviour of carboxylic acid in reversed-phase column liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 167, 1-16, 1978.
126. Bowman, D.B.; Aravind, M.K.; Miceli, J.N.; Kauffman, R.E. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method to determine ceftriaxone in biological fluids. *J. Chromatogr.* 309, 209-213, 1984.
127. Bafeltowska, J.; Suszman, E.; Krzysztof, M.; Hawranek, J. Determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 976, 249-254, 2002.
128. Péhourcq, F; Jarry, C. Determination of third-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. A.* 812, 159-178, 1998.
129. Martínez, L.; Falcó, P.; Cabeza, A. Comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29, 405-423, 2002.
130. Bayoumi, S; Vallner, J.; Dipiro, J. Quantitation of cefazolin sodium in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* 30, 57-61, 1986.
131. Rosseel, M.T.; Pelman, R.; Hoorebeke, H. Measurement of cefuroxime in human bronchoalveolar lavage fluid by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B.* 689, 438-441, 1997.

132. Shalini, J. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 795-809, 2002.
133. Kearns, G.L.; Johnson, V.A.; Hendry, I.R.; Wells, T.G. Microanalytical high-performance liquid-chromatographic assay for cefpirome in human milk and urine. *J. Chromatogr.* 112, 356-360, 1992.
134. Guitton, J.; Laffont, A.; Bruzeau, J.; Rochert-Mingret, L.; Bonnefoy, M.; Bureau, J. Determination of ceftazidime in plasma using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. Application for individualizing dosage regimens in elderly patients. *J. Chromatogr. B.* 719, 151-157, 1998.
135. Yun, E.; Price, A.; McMillin, J.; Welch, L. High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins. *J. Chromatogr.* 712, 145-152, 1998.
136. Fasching, C.E.; Peterson, L.R.; Gerding, D.N. High pressure liquid chromatographic analysis for quantitation of BMY-28142 and ceftazidima in human and rabbit serum. *J. of Liq. Chromatogr.* 9, 1803-1814, 1986.
137. Barbahaiya, R.H.; Forgue, S.T.; Shyu, W.C.; Papp, E.A.; Pittman, K.A. High-pressure liquid chromatographic analysis of BMY-28142 in plasma and urine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 55-59, 1987.
138. Elkhaili, H.; Linger, L.; Monteil, H.; Jehl, F. High-performance liquid chromatographic assay for cefepima in serum. *J. of Chromatogr. B.* 690, 181-188, 1997.
139. Rabouan-Guyon, S.M.; Guet, A.F.; Courtois, P.Y.; Barthes, D.M. Stability study of cefepima in different infusion solutions. *International J. of Pharm.* 154, 185-190, 1997.
140. Ip, M.; Asu, C.; Cheung, S.W.; Chan, C.Y.; Cheng, A.F.B. A rapid high-performance liquid chromatographic assay for cefepime, cefpirome and meropenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 121-123, 1998.
141. Fubara, J.; Notari, R. Influence of pH, temperature and buffer on cefepima degradation kinetics and stability predictions in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* 87, 1572-1576, 1998.
142. Calahorra, B.; Campanero, M.A.; Sábada, B.; Azanza, J.R. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of cefepima in human plasma. *Biom. Chromatogr.* 13, 272-275, 1999.

143. Maddox, F.C.; Stewart, J.T. HPLC determination of an aqueous cefepima and metronidazole mixture. *J. Liquid Chromatogr.* 22, 2807-2813, 1999.
144. Valassis, I.N.; Parissi-Poulou, M.; Macheras, P. Quantitative determination of cefepime in plasma and vitreous fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 721, 249-255, 1999.
145. Breilh, D.; Lavalle, C.; Fratta, A.; Ducint, D.; Cony-Makhoul, P.; Saux, M.C. Determination of cefepime and ceftiofime in human serum by high-performance liquid chromatography using an ultrafiltration for antibiotics serum extraction. *J. Chromatogr. B.* 734, 121-127, 1999.
146. Williamson, J.C.; Volles, D.F.; Lynch, P.L.; Rogers, P.D.; Haverstick, D.M. Stability of cefepima in peritoneal dialysis solution. *Ann Pharmacother.* 33, 906-909, 1999.
147. Stewart, J.T.; Warren, F.; Maddox, F.C. Stability of cefepima hydrochloride injection in polypropylene syringes at -20, 4 and 22-24°C. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56, 457-459, 1999.
148. Cherti, N.; Kinowski, J.; Lefrant, J.; Bressolle, F. High-performance liquid chromatographic determination of cefepime in human plasma and urine and dialysis fluid using a column-switching technique. *J. Chromatogr. B.* 754, 377-386, 2001.
149. Chang, Y.L.; Chou, M.H.; Lin, M.F.; Chen, C.F.; Tsai, T.H. Determination and pharmacokinetic study of unbound cefepima in rat bile by liquid chromatography with on-line microdialysis. *J. Chromatogr. A.* 914, 77-82, 2001.
150. Bugnon, D.; Giannoni, E.; Majcherczyk, P.; Glauser, M.P.; Moreillon, P. Pitfalls in cefepime titration from human plasma: plasma and temperature related drug degradation in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3654-3656, 2002.
151. Musia, W.; Zajac, M. Stability of cefepima dihydrochloride monohydrate in solid state. *Acta Poloniae Pharm.* 59, 243-246, 2002.
152. Trissel, L.; Xu, Q. Stability of cefepima hydrochloride in autodose infusion system bags. *Annals Pharmacotherapy.* 37, 804-807, 2003.
153. Mrestani, Y.; Neubert, R.; Munk, A.; Wiese, M. Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis. *J. of Chromatogr. A.* 803, 273-278, 1998.

154. Ródenas, V.; Parra, A.; García-Villanova, J.; Gómez, M.D. Simultaneous determination of cefepime and L-arginine in injections by second-derivate spectrophotometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1095-1099, 1995.
155. Evagelou, V.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Koupparis, M. Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and cefpirome using UV spectrometry and pH potenciometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 1119-1128, 2003.
156. Özkan, S.; Uslu, B.; Zuman, P. Electrochemical reduction and oxidation of the antibiotic cefepime at a carbon electrode. *Anal. Chim. Acta.* 21819, 1-10, 2002.
157. Jiménez Palacios, F.J.; Callejón Mochón, M.; Jiménez Sánchez, J.C.; Herrera Carranza, J. Electrochemical reduction of cefepime at the mercury electrode. *Electroanalysis.* 12, nº 4, 296-300, 2000.
158. Jiménez Palacios, F.J.; Callejón Mochón, M.; Jiménez Sánchez, J.C.; Herrera Carranza, J. Adsorptive stripping voltammetric determination of cefepime at the mercury electrode in human urine and cerebrospinal fluid, and differential pulse polarographic determination in serum. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 92. 1854-1859, 2003.
159. Miller, J.C.; Miller, J.N. *Estadística para química analítica.* 2ª Ed. Addison Wesley Iberoamericana. 1993.
160. IUPAC. Commission on spectrochemical and other optical procedures for analysis. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis, II. *Spectrochim. Acta.* 33, 242, 1978.
161. Kellner, R.; Mermet, J.; Otto, M. Widmer, H. *Analytical chemistry: the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry.* Anal. Chem., Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 1998.
162. Meites, L. *Polarographic techniques.* 2ª ed. Interscience Publishers, J. Welley & Sons Inc. New York, 1965.
163. Birke, R.L.; Kim, M.; Strassfeld, M. Diagnosis of reversible, quasi-reversible, and irreversible electrode processes with differential pulse polarography. *Anal. Chem.* 53, 852-856, 1981.
164. Hall, D.A.; Berry, D.M.; Schneider, D.J. The electrochemistry of cephalosporin C derivatives. *J. Electroanal. Chem.* 80, 155-170, 1977.
165. Albert, A.; Sergeant, E.P. *Ionization constants of acids and bases.* Chapman & Hall, London, 1984.



166. Strenstrom, W.; Goldsmith, N. Determination of the dissociation constants of phenol and the hydroxyl group of tyrosine by means of absorption measurements in the ultra-violet. *J. Phys. Chem.* 30, 1683-1687, 1926.
167. Budesinsky, B. Acidity of several chromotropic acid azo derivatives. *Talanta* 16, 1277-1288, 1969.
168. Navas, M.J.; Jiménez Trillo, J.L.; Suero, A.G. Métodos gráficos para la determinación espectrofotométrica de constantes de acidez. *Estratto da Bolletino Chimico Farmaceutico*, 124, 439-450, 1985.
169. González, A.G.; Asuero, A.G. Computational method for unbiased evaluation of equivalent volume and ionization constants from potentiometric acid-base titrations. *Analytica Chimica Acta*, 257, 29-33, 1992.
170. Gran, G. Equivalence volumes in potentiometric titrations. *Analytica Chimica Acta*, 206, 111-123, 1988.
171. Gasco Sánchez, L. Teoría y práctica de la cromatografía en fase gaseosa. J.E.N., Madrid, 1970.
172. International Conference on Harmonization (ICH), Q2b: Validation of Analytical Procedures: Methodology, US FDA Federal Register, Vol. 60, May 1997, p. 27463.
173. Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation. US Food and Drug Administration, February 1987.
174. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, 1994.
175. US Pharmacopeia 24, validation of compendial methods, section 1225, United States Pharmacopeal convention, Rockville, MD, 1999.
176. Vincent, J.I.; Bihari, D.J.; Suter, P.M. The prevalence of nosocomial infection in UCI in Europe. *JAMA*. 274, 639-644, 1995.
177. Modai, J. Diffusion of 3-quaternary ammonium cephem antibiotics into cerebrospinal fluid with bacterial meningitis. *Journal of chemotherapy*. 8, 83-90, 1996.
178. Barnes, B.J.; Wiederhold, N.P.; Micek, S.T.; Polish, L.B.; Ritchie, D.J. *Enterobacter cloacae* ventriculitis successfully treated with cefepime and gentamicin: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy*. 23 (4), 537-542, 2003. *Pharmacotherapy*. 23 (3), 310-314, 2003.

179. Rhoney, D.H.; Tam, V.H.; Parker, D.; Mckinnon, P.S.; Coplin, W.M. Disposition of cefepime in the central nervous system of patient with external ventricular drains. *Pharmacotherapy*. 23 (3), 310-314, 2003.
180. Lipman, J.; Wallis, S.C.; Richard, C. Low plasma cefepime levels in critically III septic patients: pharmacokinetic modelling indicates improved throughs with revised dosing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2559-2561, 1999.
181. Doménech, J.; Martínez, J.; Plá, J.M. *Biofarmacia y farmacocinética. Volumen I: Farmacocinética. Síntesis.* Madrid.
182. Sánchez Navarro, A. Optimización de la posología antibacteriana (I): criterios microbiológicos y farmacocinéticos. *Pharm. Care Esp.* 1, 395-401, 1999.
183. Sánchez Navarro, A. Optimización de la posología antibacteriana (II): metodología para la individualización posológica dual en la práctica clínica. *Pharm. Care Esp.* 2, 153-159, 2000.
184. Craig, W.A. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodybamics in determining dosage regimens for broad spectrum cephalosporins. *Diag. Microb. Inf. Dis.* 22, 89-96, 1995.
185. Tam, V.H.; Louie, A.; Lomaestro, B.M.; Drusano, G.L. Integration of population pharmacokinetics, a pharmacodynamic target, and microbiologic surveillance data to generate a rational empiric dosing strategy for cefepime against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy*. 23 (3), 291-295, 2003.
186. Tam, V.H.; Mckinnon, P.S.; Akins, R.L. Pharmacodynamics of cefepime in patients with gram-negative infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 425-428, 2002.
187. Lutsar, J.; Friedland, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cephalosporins in cerebrospinal fluid. *Clin. Pharmacokinet.* 39, 335-343, 2000.
188. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS document M100-S11, vol. 21, nº 1. Wayne, PA: NCCLS, 2001.
189. Boselli, E.; Dominique, B.; Duflo, F.; Saux, M.V.; Debom, R.; Chassard, D.; Allaouchiche, B. *Crit. Care med.* 31 (8), 2102-2106, 2003.

---

## **ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS**

Tabla 1.3. Datos farmacocinéticos de cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación administrada por vía parenteral.

Fármaco	Dosis (mg)	Vía	C <sub>máx</sub> (mg/L)	T <sub>1/2</sub> (h)	Fijación proteica (%)	Eliminación (% dosis)
Cefalotina	1000	IM	40	0.5	60	Renal, 50
Cefazolina	1000	IM	20	0.8	70	Renal, 70
Cefaloridina	1000	IM	25	1.1	20	Renal, 80
Cefapirina	1000	IM	36	0.4	50	Renal, 60
Cefalexina	1000	IM	48	0.9	10	Renal, 95
Cefradina	1000	IM	30	1.0	8	Renal, 95
Cefonicid	1000	IV	150	4.5	98	Renal, 95
Cefonicid	1000	IM	100	4.5	98	Renal, 95
Cefuroxima	750	IM	27	1.4	40	Renal, > 90
Cefuroxima	1500	IV	100	1.4	40	Renal, > 90
Cefamandol	1000	IV	90	1	75	Renal, > 90
Cefamandol	1000	IM	25	1	75	Renal, > 90
Cefoxitina	1000	IV	110	0.8	70	Renal, 85
Cefoxitina	1000	IM	24	0.8	70	Renal, 85
Cefmetazol	1000	IV	180	1.3	85	Renal, 80
Cefotetan	1000	IV	160	3.5	85	Renal, 80
Cefotetan	1000	IM	70	3.5	85	Renal, 80
Cefotaxima	1000	IV	80	1	40	Renal, 80
Cefotaxima	1000	IM	25	1	40	Renal, 80
Ceftriaxona	1000	IV	50	8	90	Renal, 50 y Biliar, 30
Ceftriaxona	1000	IM	80	8	90	Renal, 50 y Biliar, 30
Ceftazidima	1000	IV	80	1.8	20	Renal, 85

Ceftazidima	1000	IM	40	1.8	20	Renal, 85
-------------	------	----	----	-----	----	-----------

Tabla 1.4. Datos farmacocinéticos de las cefalosporinas orales.

Fármaco	Dosis (mg)	Adsorción oral (%)	C <sub>máx</sub> (mg/L)	T <sub>1/2</sub> (h)	Fijación proteica (%)	Eliminación (% dosis)
Cefalexina	500	> 95	6	0.9	10	Renal, 95
Cefadrina	500	> 95	16	4.5	20	Renal, 90
Cefadroxiilo	500	90	16	1.5	20	Renal, 95
Cefprozilo	500	90	10	1.3	35	Renal, 70
Cefaclor	500	90	10.5	0.6	25	Renal, 61
Cefuroxima	500	60	5.9	1.4	40	Renal, 55
Cefixima	200	40-50	2	3-5	66	Renal, 21
Cefpodoxima proxético	200	50	2.6	2.2	21	Renal, 24
Ceftibuteno	200	67	11.6	1.9	63	Renal

Tabla 1.5. Espectro antibacteriano de las cefalosporinas.

Germen patógeno	1ª Generación		2ª Generación			3ª Generación			4ª Generación
	Cefalexina	Cefazolina	Cefaclor	Cefuroxima	Cefoxitina	Cefpodoxima	Cefotaxima	Ceftazidma	Cefepima
<b>GRAM (+)</b>									
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	++	++	+	+	++	+	++
<i>Streptococcus pyogenes</i>	++	++	++	++	++	++	++	+	++
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	++	++	++	+	+	++	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GRAM (-)</b>									
<i>Acinetobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-	-	++	-	+	-	-
<i>Enterobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	++

<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++
<i>Klebsiella spp.</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	-	-	+	+	++	++	+	++	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	+	+	++	++	++	++

Signos (-): actividad nula o muy limitada; (+): moderada; (++): elevada.

Tabla 1.9. Características polarográficas de algunas cefalosporinas.

Cefalosporina	Técnica polarográfica	pH	-E (V)	Fluido	L.D (µg/ml).
Cefalotina	DPP	2	-1	agua	0.1
Cefaloridina	DPP	4	-1.06/-1.28	agua	0.1
Cefazolina	DPP	3	-0.64	agua	0.01
Cefacetrilo	DPP	1	-0.984	agua	0.07
Cefamandol	DPP	3	-0.744	agua	0.07
Cefuroxima	DPP	2.5	-0.39/-1.02	agua	0.1

Cefotaxima	DPP	2	-0.44/-0.93	agua	0.02
Cefsulodina	DPP, DC	2.97	-0.7/-1/-1.15	agua	1
Cefoperazona	DPP	7	-1.088/-1.328	agua	0.067
Ceftriaxona	DPP	4	-0.72	orina	0.008
Ceftizoxima	DPP	4	-0.65	orina	0.008
Ceftazidima	DPP	4	-0.608	orina	0.008
Cefetamet	DPP, DC	8.4	-1.15	agua	0.008

L.D. = Límite de detección.

*Tabla 1.10. Condiciones de redisolución de algunas cefalosporinas.*

<b>Cefalosporina</b>	<b>pH</b>	<b>Potencial de acumulación (V)</b>	<b>Tiempo de deposición</b>	<b>L.D. (M)</b>
Ceftriaxona	4	-0.2	12 min	$5 \cdot 10^{-9}$
Cefazolina	3.6	-0.2	14 min	$2 \cdot 10^{-9}$



Cefotaxima	5	-0.1	10 min	$10^{-9}$
Cefuroxima	4	-0.1	5 min	$5 \cdot 10^{-10}$
Cefoperazona	2	-0.4	4 min	$2 \cdot 10^{-9}$
Cefalotina	1	-0.9	60 s	$10^{-8}$
Cefaclor	8	-0.1	60 s	$10^{-8}$

L.D. = Límite de detección.

Tabla 1.11. Condiciones cromatográficas para algunas cefalosporinas.

Cefalosporina	Muestras	Columna	Fase móvil	Detección (nm)	L.D. (µg/ml)
Cefalexina	Agua	Hypersil ODS	ACN-fosfato sódico pH: 3	254	---
Cefazolina	Suero, músculo	µBondapak C <sub>18</sub>	ACN-tampón acetato pH:3.8 (11:89)	254	0.1
Cefradina	Suero	Ultrasphere C <sub>8</sub>	MeOH- tampón fosfato pH: 2.6 (20:80)	240	1
Cefadroxilo	Agua	Hypersil ODS	Fosfato monopotásico –ACN pH:3.4	254	---
Cefoxitina	Agua	Hypersil ODS	Fosfato monopotásico –ACN pH:3.4	254	---
Cefuroxima	Fluido pulmonar	Symmetry C <sub>18</sub>	ACN-0.05 M tampón fosfato amónico pH:3.2 (15:85)	280	1
Cefotetan	Suero, orina	Lichrosorb RP-18	ACN- tampón fosfato pH: 6.4 (7.5:92.5)	280	0.3
Cefotian	Suero, orina	Lichrosorb RP-18	MeOH-0.02 M tampón fosfato (24:76)	254	---
Cefoperazona	Suero	C <sub>18</sub>	ACN-TMAC-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O (30:0.1:0.03:69.87)	254	1

Cefotaxima	LCR	Lichrospher 100-RP-18	MeOH-0.01 M tampón acetato pH:4.8 (15:85)	254	0.39
Ceftazidima	Suero	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	ACN-ácido acético (10:90)	275	1.5
Ceftriaxona	Suero, orina, LCR	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	ACN- 10 mM fosfato potásico pH:9	274	---
Latamoxef	Plasma, bilis	Lichrosorb C <sub>8</sub>	MeOH-0.01 M tampón fosfato pH:7 (10:90)	268	---
Cefixima	Suero, LCR	Ultrasphere C <sub>8</sub>	ACN- 0.01 M tampón fosfato pH:2.7 (15:85)	280	0.05
Cefetamet	Plasma	Spherisorb ODS I	ACN- 4 mM ácido perclórico (17:83)	265	0.5
Cefpodoxima	Suero, orina	Ultrasphere XL-ODS	ACN- 21.5 mM acetato amónico pH:5 (7:93)	254	0.2
Cefpiroma	Leche, orina	Spherisorb ODS II	MeOH-trietilamina (12:88)	240	0.625

L.D.= límite de detección.

ACN = Acetonitrilo.

TMAC = cloruro de tetrametilamonio.

MeOH = metanol.

LCR = líquido cefalorraquídeo.



Tabla 6.17. Comparación de métodos cromatográficos.

Referencia bibliográfica	Columna	Fase móvil	Flujo (ml/min)	Detección (nm)	t <sub>R</sub> (min)	Rango de concentración (mg/l)	LD/LC (mg/l)	Extracción en suero (%)
[144]	Hypersil BDS C <sub>18</sub>	MeOH 13%-25 mM dihidrogeno fosfato de sodio monohidrato, pH 3 (13:87)	1	270	4.8	1-50	0.83/2.52	97.3
[148]	Nucleosil C <sub>18</sub>	ACN-acetato amónico, pH 4 (10:90)	1	280	3.9	0.5-100	0.2/0.5	86
[138]	Ultrasphere XL-ODS	ACN 7%-20mM acetato amónico, pH 4	1	254	1.8-2.2	0.1-50	0.1/0.5	106.2
[136]	Micro-Bondapak C <sub>18</sub>	ACN 5%-acido acético, pH 2.8	2	275	5.3	0.625-80	---/0.625	93
[142]	Hypersil BDS C <sub>18</sub>	ACN-50mM acetato amónico- acido acético 4%, pH 4 (2.8:97.2)	1	254	4.4	0.5-500	0.15/0.5	104
Método propuesto	LiChrospher 100 RP-18	Tampón fosfato 10 mM, pH 7: metanol (75:25)	1	256	2.8	0.3-200	0.1/0.3	100
			0.5		5.6	0.24-50	0.08-0.24	

ACN = acetonitrilo

MeOH = metanol

LD = límite de detección

LC = límite de cuantificación

