

**«EFECTO CATALITICO DEL BUFFER DE TRIS SOBRE LA  
DEGRADACION DE ALGUNAS  
DESACETOXICEFALOSPORINAS»**

*Por J. G. Prieto y  
F. Salto*

**INTRODUCCION**

Con el nombre de Desacetoxicefalosporinas se conoce una familia de antibióticos que tienen como núcleo común el ácido 7-Aminodesacetoxicefalosporánico, diferenciándose unas de otras en la cadena lateral.

Mediante transformación de anillo tiazolidin de la bencilpenicilina en anillo de tiazina, se obtiene la 7-Fenilacetamidodesacetoxicefalosporina (7-FADC). Por hidrólisis de la cadena lateral del 7-FADC se obtiene el ácido 7-Aminodesacetoxicefalosporánico (7-ADCA) y por acilación de éste con diferentes radicales se producen las distintas desacetoxicefalosporinas. La 7-D(-) $\alpha$  Aminofenilacetamidodesacetoxicefalosporina (Cefalexina) es una de las desacetoxicefalosporinas de mayor interés terapéutico por ser sensible tanto a gérmenes gram-positivos como a gram-negativos.

El objeto del presente trabajo es estudiar el posible efecto catalítico del buffer de TRIS sobre la descomposición de las desacetoxicefalosporinas, representadas por el 7-FADCK y la Cefalexina.

Se ha realizado este trabajo en primer lugar por el interés que tiene en sí, dada la falta de información sobre la estabilidad de las desacetoxicefalosporinas en las condiciones de nuestro estudio y en segundo término porque puede contribuir a esclarecer los problemas sobre las alergias a las cefalosporinas, pensando en un posible paralelismo con las penicilinas, pues es un hecho conocido que en la alergia de las penicilinas el principal determinante antigénico es el grupo Peniciloilo formado por la reacción de las penicilinas con el grupo  $\epsilon$ -amino de las proteínas.

## MATERIAL Y METODOS

### *Características de los productos utilizados:*

Para la preparación de los reactivos se han empleado productos puros «reactivos análisis de la casa Merck».

La 7-FADCK, ha sido cedida por el departamento de investigación de Antibióticos, S. A. y posee una pureza del 95 % determinada por el método hidroxámico.

La Cefalexina monohidrato empleada posee una actividad de 940  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y una humedad del 5,2 %.

Con el fin de poder fijar el pH en cada experimento y mantenerlo constante durante el proceso de descomposición de las cefalosporinas, se han empleado en todos los casos disoluciones reguladoras de TRIS-ClH, a pH variables entre 7,0 y 9,2, y fuerza iónica constante 0,5 (Cl Na).

### *Datos cinéticos:*

En todos los ensayos se ha seguido el procedimiento que transcribimos a continuación:

312,5 mg de cefalosporina, se disuelven a 40° C en 250 ml de disolución reguladora apropiada. Seguidamente se coloca la disolución en un baño a la temperatura de 40° C  $\pm$  0,1. A intervalos adecuados se toman muestras de 20 ml y se neutralizan a pH 6,5, quedando congelada en este momento la reacción.

Se ajusta el volumen a 25 ml con agua destilada en una matraz aforado y se guarda en nevera a 3° C para su posterior análisis.

### *Valoración de Cefalexina en presencia de sus productos de degradación:*

Para la valoración de la Cefalexina se ha seguido el método de hidroxilamina<sup>3</sup>.

Para contrastar la validez del método hidroxámico en el estudio de la cinética de degradación de la Cefalexina en disolución acuosa, fue necesario estudiar sus límites de validez cuando están presentes los productos de degradación. Con ese objeto se prepararon una serie de disoluciones que contenían proporciones diferentes de Cefalexina y de sus productos de degradación en medio básico.

La disolución de los productos de degradación de Cefalexina se obtuvo pesando 500 mg y disolviéndolos en 250 ml de agua destilada, añadiendo 200 ml de NaOH (0,1 N) y dejándolo a 35° C durante 55 minutos. Se neutralizó a pH 6,5 con ClH (2 N) y se enrasó a 500 ml en un matraz aforado. Una vez comprobado que toda la cefalexina estaba desactivada, se mezclaron partes alícuotas de esta disolución con distintos volúmenes de otra que contenía 1 mg de Cefalexina por ml de disolución.

Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla:

Cefalexina puesta mg/ml .....	1,00	0,80	0,60	0,40	0,20
Cefalexina degradada mg/ml	0,00	0,20	0,40	0,60	0,80
Cefalexina hallada mg/ml ....	0,99	0,78	0,60 <sub>6</sub>	0,39 <sub>6</sub>	0,20 <sub>6</sub>
Cefalexina recuperada % ....	99,00	98,00	101,00	99,00	103,00

De igual forma se ha comprobado la validez del método hidroxámico para valorar 7-FADC en presencia de sus productos de degradación.

## RESULTADOS

### *Determinación del pK de las desacetoxicefalosporinas:*

Para poder hallar la forma disociada o indisociada en que se encuentran las disoluciones de 7-FADCK y Cefalexina a los pH de nuestro estudio, ha sido necesario determinar experimentalmente el valor de los correspondientes pK en las condiciones de nuestro trabajo.

El método seguido para la determinación de los pK ha sido el potenciométrico<sup>2</sup> habiéndose encontrado los siguientes resultados en disolución acuosa, fuerza iónica 0,5 y 40° C:

7-FADCK .....	pK = 2,93 $\pm$ 0,06
Cefalexina .....	pK <sub>1</sub> = 3,01 $\pm$ 0,12
	pK <sub>2</sub> = 6,89 $\pm$ 0,02

### *Orden de las reacciones de descomposición:*

Los resultados obtenidos indican que a 40° C, fuerza iónica 0,5 y pH constante, la hidrólisis del 7-FADCK y de la Cefalexina siguen una reacción de pseudoprimer orden respecto a la concentración de desacetoxicefalosporina.

### *Constantes de velocidad de degradación del 7-FADCK y Cefalexina:*

En cada uno de los experimentos realizados, la constante de velocidad de descomposición se ha calculado como el valor medio de las constantes de velocidad específicas, obtenidas para cada tiempo siguiendo el método de integración.

Los porcentajes de desacetoxicefalosporinas activas empleados en el cálculo de estas constantes han sido los valores correspondientes tomados de la recta interpolada, al representar a escala semilogarítmica las concentraciones de las desacetoxicefalosporinas activas en función de los intervalos de tiempo correspondientes.

El conjunto de estas rectas correspondientes a la cinética de degradación del 7-FADCK y de la Cefalexina a los distintos pH estudiados se recogen en las figuras 1 y 2 respectivamente.

*Efecto catalítico de la disolución reguladora de TRIS sobre la descomposición de desacetoxicefalosporinas:*

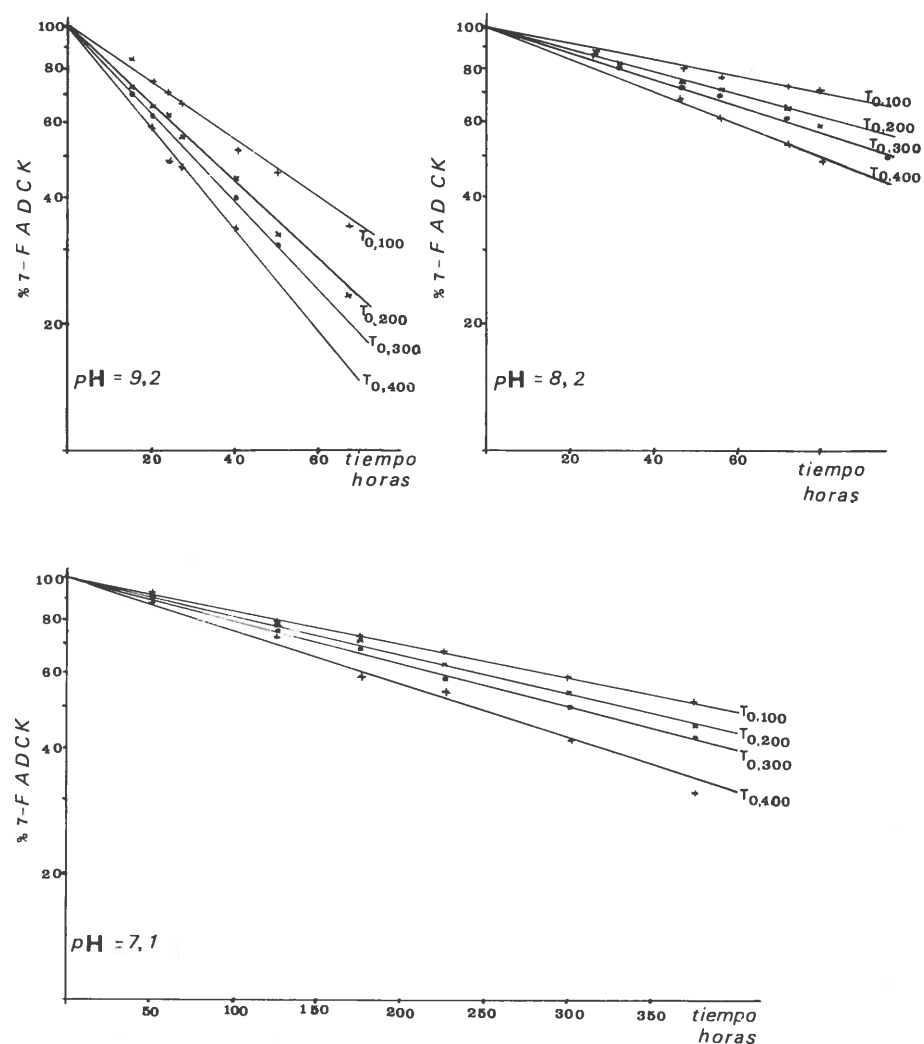


Fig. 1

En la descomposición hidrolítica de las desacetoxicefalosporinas, además del efecto específico del ión hidróxido, hemos detectado que las especies químicas de la disolución reguladora de TRIS producen también efectos catalíticos.

Para estudiar el efecto catalítico de las especies químicas de la disolución

reguladora de TRIS se han determinado las constantes de degradación, estando presentes cada una de ellas, pero variando su concentración total y manteniendo constantes el pH, la temperatura, la concentración de desacetoxicefalosporina y la fuerza iónica en cada serie.

Representando las constantes de velocidad de pseudoprimer orden halladas frente a la concentración total de disolución reguladora se obtiene para cada

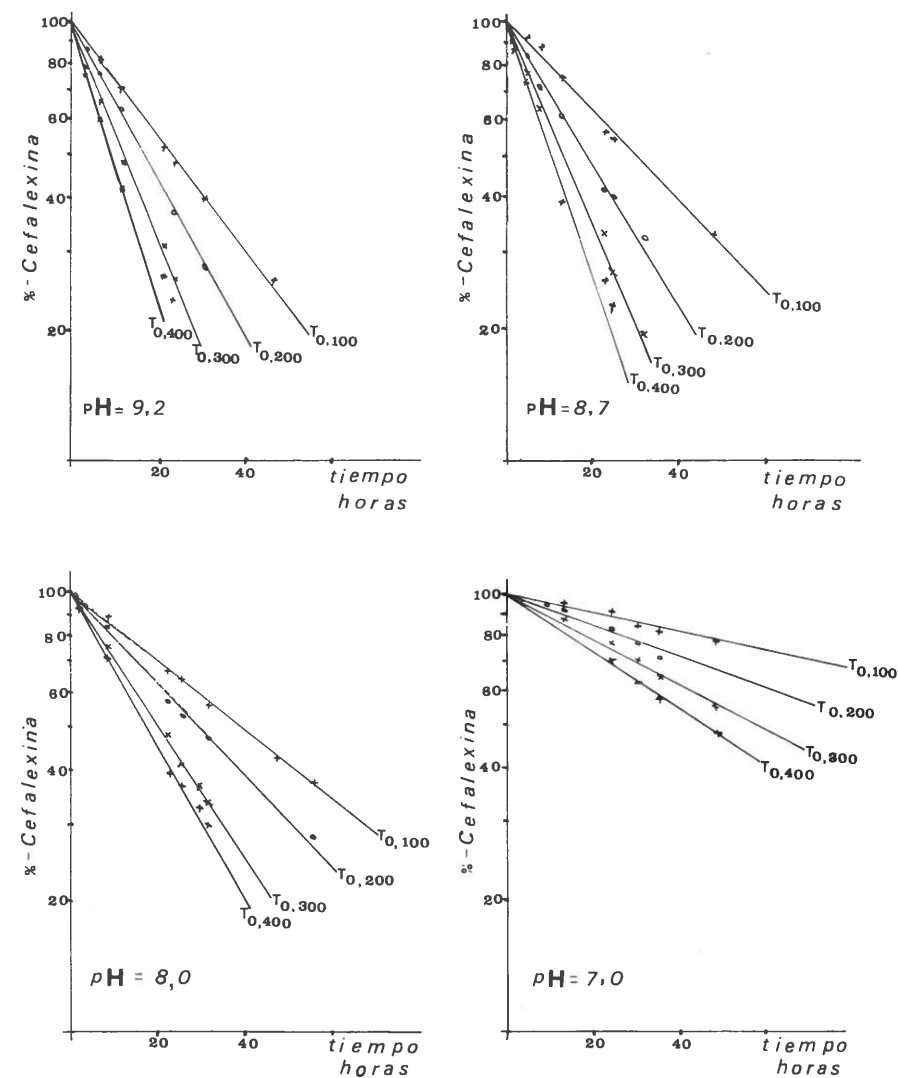


Fig. 2

pH una línea recta, cuya pendiente nos mide la actividad catalítica de la disolución reguladora empleada en cada caso.

Las pendientes positivas obtenidas nos indican el efecto catalítico de la disolución reguladora de TRIS sobre el 7-FADCK y la Cefalexina (Fig. 3).

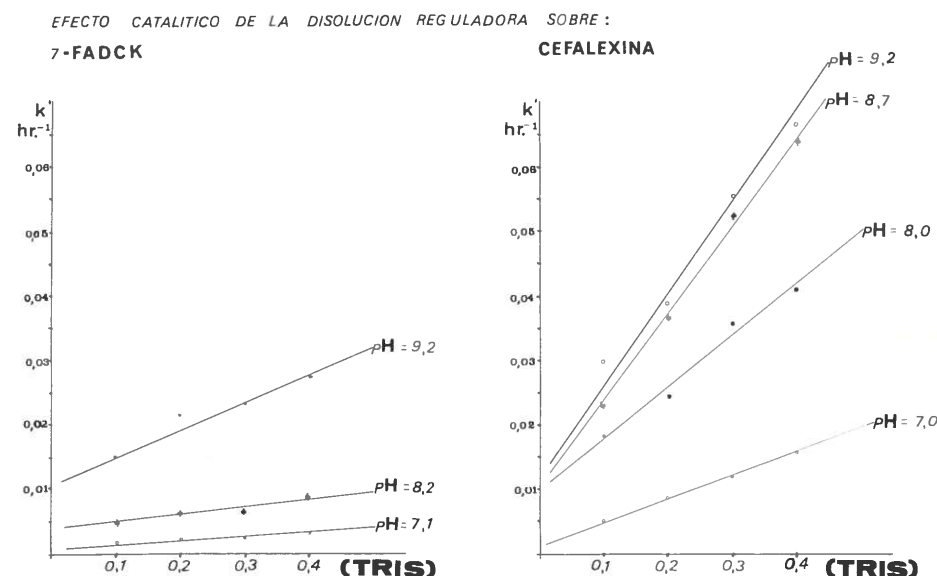


Fig. 3

## DISCUSION

*Cinética y mecanismo de degradación de desacetoxicefalosporinas en medio alcalino:*

El anillo  $\beta$ -lactama de penicilinas y cefalosporinas es especialmente inestable; mucho más que las lactamas y amidas ordinarias. Esta reactividad se puede justificar debido a que las estructuras  $\beta$ -lactamas-tiazolidín en las penicilinas y las  $\beta$ -lactamas-tiazín en las cefalosporinas no son coplanarias originándose la supresión de la resonancia típica de las amidas simples, con el resultado de que el  $\beta$ -lactama adquiere una reactividad mucho mayor<sup>6</sup>.

El ejemplo más sencillo de ataque nucleofílico sobre las  $\beta$ -lactamas es la reacción con los iones hidróxilos.

De los resultados experimentales obtenidos se deduce que la concentración de iones hidróxilos influye en la velocidad de degradación, así como que la disolución reguladora de TRIS ejerce un efecto catalítico. Con objeto de aislar el primero de estos efectos se extrapola el valor de la constante de velocidad a concentración cero de disolución reguladora.

De esta forma se han obtenido los valores de  $k'_0$  a cada pH, a temperatura de 40° C y fuerza iónica 0,5.

Los resultados obtenidos para la Cefalexina y el 7-FADCK comparativamente con los obtenidos de la bibliografía (4) para la Ampicilina (ésta a 35° C y fuerza iónica 0,5) están recogidos en la tabla siguiente:

CEFALEXINA		7-FADCK		AMPICILINA	
pH	$k'_0$ hr <sup>-1</sup>	pH	$k'_0$ hr <sup>-1</sup>	pH	$k'_0$ hr <sup>-1</sup>
7,0	0,0015	7,1	0,0010	7,6	0,002
8,0	0,0100	8,2	0,0045	8,4	0,015
8,7	0,0117	9,2	0,0112	9,4	0,124
9,2	0,0145				

Como puede observarse a pH próximos a la neutralidad los valores de los  $k'_0$  son significativamente mayores en las desacetoxicefalosporinas que la ampicilina, mientras que a pH más alcalino (superiores a 9) la constante de velocidad para la ampicilina es mucho mayor. Esto nos pone de manifiesto por un lado que el ataque puramente hidrolítico es más importante en las desacetoxicefalosporinas que en las penicilinas, y por otro que la acción de los iones hidróxilo es mucho más acentuada sobre la  $\beta$ -lactama de la ampicilina que sobre las desacetoxicefalosporinas.

Es de resaltar también la poca influencia que ejerce la cadena lateral sobre la velocidad de hidrólisis de las desacetoxicefalosporinas. No obstante la diferencia de reactividades puede deberse a que en el caso de la Cefalexina están implicados un ataque nucleofílico, intra o intermolecular, del grupo amino de la cadena lateral.

Descartamos la reacción intermolecular debido a que la velocidad de hidrólisis para un pH dado es independiente de la concentración de  $\beta$ -lactama. Según esto, los mecanismos de degradación del 7-FADCK y de la Cefalexina serían distintos.

Según el esquema de la figura 4, en la hidrólisis del 7-FADCK se produciría fundamentalmente un ataque de los iones hidroxilo al carbonilo de la  $\beta$ -lactama produciéndose la apertura de ésta, dando lugar al ácido desacetoxicefalosporoico inestable<sup>1</sup>, mientras que en la hidrólisis de la Cefalexina se produciría un ataque nucleofílico intramolecular del  $\alpha$ -amino de la cadena lateral sobre el carbonilo de la  $\beta$ -lactama, para producir probablemente la Piperacina-2-5-diona.

Compuestos de este tipo han sido aislados recientemente a partir de ésteres de cefalosporinas<sup>5</sup>. No obstante a pH fuertemente alcalino muy probablemente tenga más importancia el ataque directo de los iones hidroxilo sobre la forma aniónica de la Cefalexina.

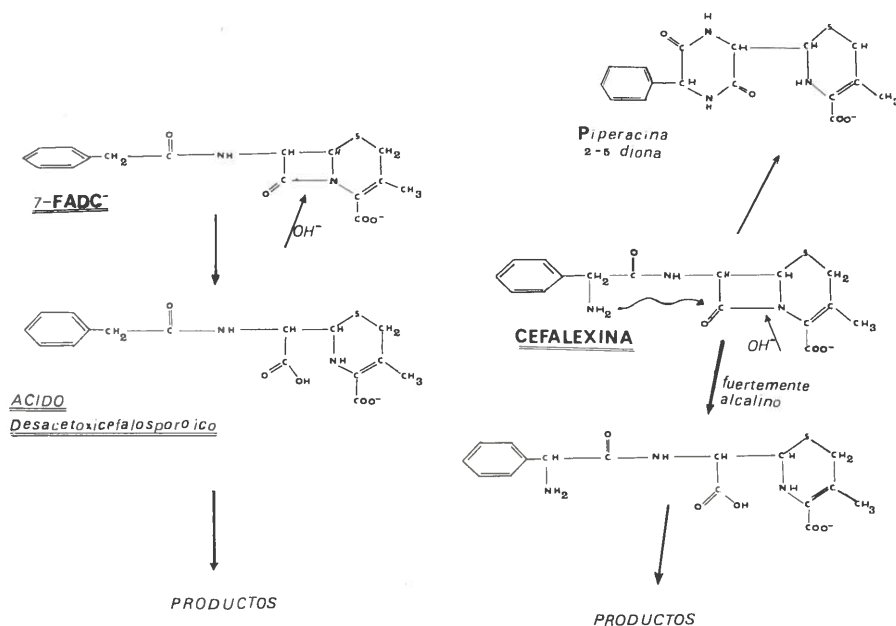


Fig. 4

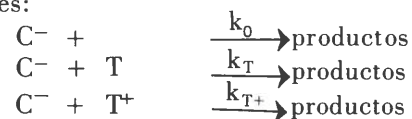
En contra de lo que podría suponerse, la Ampicilina no sigue un mecanismo de degradación semejante a la Cefalexina, debido a que en las penicilinas existe un impedimento estérico causado por el grupo gem-dimetil y/o el H del C-3, mientras que en las desacetoxicefalosporinas no existe este impedimento estérico para el ataque intramolecular del grupo amino de la cadena lateral.

*Efecto catalítico de la disolución reguladora de TRIS sobre las desacetoxicefalosporinas:*

Además del efecto de los iones hidroxilo se ha comprobado la existencia de una ligera actividad catalítica de la disolución reguladora de TRIS sobre la degradación del 7-FADCK.

A los pH estudiados (7,0 a 9,2) la 7-Fenilacetamidodesacetoxicefalosporina se encuentra en forma aniónica mientras que las especies químicas de la disolución reguladora de TRIS pueden estar en las formas de grupo amino libre (T) y protonizada (T<sup>+</sup>).

La velocidad total de la reacción de hidrólisis será la suma de las siguientes reacciones parciales:



donde C<sup>-</sup> representa al 7-FADCK en forma aniónica.

La velocidad total del sistema así formado será igual a la suma de todas las reacciones particulares que lo integran:

$$\frac{d(C^-)}{dt} = k_0(C^-) + k_T(C^-)(T) + k_{T^+}(C^-)(T^+) = k'(C^-)$$

$$\text{dividiendo por } (C^-): k' = k_0 + k_T(T) + k_{T^+}(T^+)$$

Teniendo en cuenta el equilibrio de disociación del TRIS y llamando (TRIS)<sub>T</sub> a la concentración total de TRIS se obtiene la expresión:

$$k' = k_0 + k_T \frac{(\text{TRIS})_T \cdot K}{(H) + K} + k_{T^+} \frac{(\text{TRIS})_T \cdot (H^+)}{(H^+) + K} (*)$$

La representación gráfica de las constantes de velocidad observadas (k') frente a la concentración total de TRIS según la ecuación (\*) nos tiene que dar una recta para cada pH, tal como se refleja en la figura 3, que representa los valores hallados experimentalmente en las condiciones de nuestro trabajo.

De acuerdo con la ecuación (\*) la pendiente de la recta obtenida al representar k' frente a (TRIS)<sub>T</sub> para cada pH será

$$\text{pendiente} = \frac{k_T \cdot K + k_{T^+} \cdot (H^+)}{(H^+) + K}$$

Sustituyendo en la ecuación (\*) para cada uno de los pH los valores hallados de la k' para una determinada (TRIS)<sub>T</sub> arbitraria, k<sub>0</sub> por el valor de la ordenada en el origen correspondiente y K por la constante de disociación del TRIS (= K<sub>TRIS</sub>) en las condiciones de nuestro trabajo, podremos fácilmente deducir los valores de los correspondientes coeficientes catalíticos que han resultado ser:

$$\begin{array}{l}
 k_T = 0,043 \text{ hr}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ mol} \\
 k_{T^+} = 0,00
 \end{array}$$

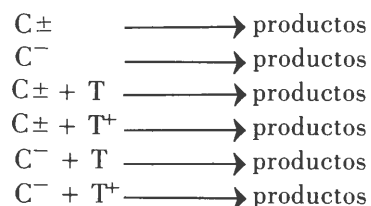
La influencia de la disolución reguladora de TRIS sobre la descomposición de la Cefalexina se estudió esencialmente del mismo modo que para el caso del 7-FADCK.

La representación gráfica de las constantes de velocidad k' frente a las concentraciones respectivas de disolución reguladora, para cada uno de los pH estudiados nos da una serie de líneas rectas (Fig. 3) que nos ponen de manifiesto, con sus pendientes positivas, que al menos algunas de las especies químicas de la disolución reguladora ejercen un efecto catalítico sobre la velocidad de descomposición de alguna de las formas de la Cefalexina.

Teniendo en cuenta las formas de la Cefalexina C<sup>±</sup> y C<sup>-</sup> y del TRIS T<sup>+</sup> y



T que pueden existir entre los pH 7 a 9,2 de nuestro estudio, las reacciones posibles son:



a pH 9,2 la Cefalexina está toda prácticamente en forma aniónica y el TRIS está en un 97,4 % en forma de amina (no protonizada), luego a este pH el efecto catalítico observado es debido exclusivamente a la acción de la forma no iónica del TRIS sobre la Cefalexina aniónica:

$$\frac{d(C)}{dt} = k_0 (C^{-}) + k_T (C^{-}) (T)$$

$$k' = k_0 + k_T (T)$$

La pendiente de la recta obtenida al representar  $k'$  frente a la concentración total de disolución reguladora (prácticamente igual a la de la forma T) nos permite hallar el coeficiente catalítico de la forma no iónica del TRIS (T) sobre la forma aniónica de la Cefalexina, que resultó ser  $k_T = 0,14 \text{ hr}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ mol}$ .

Si representamos los valores de  $k'$  obtenidos a pH 8,0 frente a las concentraciones de TRIS en forma de amina, se obtiene una recta de pendiente muy semejante a la encontrada para pH 9,2 lo que nos indica que la forma protonizada del TRIS no ejerce prácticamente acción catalítica sobre la forma aniónica de la Cefalexina:

$$k_{C^{-} \cdot T^{+}} = 0$$

La pequeña pendiente que muestra la recta obtenida para pH 7,0 nos indica que el buffer de TRIS tiene un escaso efecto catalítico sobre la degradación de la forma dipolar de la Cefalexina. Con los datos de que disponemos, una sola recta y dos posibles coeficientes catalíticos, no podemos hallar cada uno de ellos.

En la actualidad continuamos trabajando para poder determinar cada uno de estos efectos catalíticos.

## RESUMEN

Se estudia las hidrólisis de la 7-Fenilacetamidodesacetoxicefalosporina (7-FADC) y de la 7-D (-) Aminofenilacetamidodesacetoxicefalosporina (Cefalexina) en buffer de TRIS a la temperatura de 40° C y fuerza iónica constante 0,5 (ClNa) y a los pH comprendidos entre 7,0 y 9,2, habiéndose determinado los correspondientes valores de  $k_0$  para cada uno de los pH estudiados mediante extrapolación a concentración de TRIS igual a cero.

Se ha encontrado que la forma no protonizada del buffer de TRIS ejerce un ligero efecto catalítico sobre el anión del 7-FADC y una acción catalítica mayor sobre la forma aniónica de la Cefalexina; por el contrario, la forma protonizada del TRIS prácticamente no ejerce acción catalítica sobre las formas aniónicas del 7-FADC ni de la Cefalexina. Se ha detectado también una ligera acción catalítica del buffer de TRIS sobre la forma dipolar de la Cefalexina.

## SUMMARY

A study has been made of the hydrolysis of 7-phenylacetamidodeacetoxycephalosporin (7-FADC) and of 7-D(-)α aminophenylacetamidodeacetoxycephalosporin (Cephalexin) in a TRIS buffer at temperature of 40° C and with a constant ionic strength of 0.5 (NaCl) and pH values of between 7.0 and 9.2. The  $k_0$  values have been determined for each of the pH values studied by extrapolation to TRIS concentration = 0.

It was observed that the non-protonized form of the TRIS buffer has a slight catalytic effect on the anion of 7-FADC and a greater catalytic action on the anionic form of Cephalexin, but that the protonized form of TRIS has hardly any catalytic effect on the anionic forms of 7-FADC or Cephalexin. A slight catalytic action of the TRIS buffer on the dipolar form of Cephalexin was also detected.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) ABRAHAM, E. P. (1967).-«Cephalosporin C Group». Quart. Rev. London, 21, 231.
- 2) ALBERT, A., SERJEANT, E. P. (1971).-«The Determination of Ionization Constants». Chapman and Hall Ltd, 11 New Fetter Lane, London. Cap. II.
- 3) ALVAREZ, L. (1974).-«Hidroxilaminolisis de Penicilinas y Cefalosporinas. Valoración absorciométrica de la 7-FADCK». Tesina Licenciatura, Universidad de Oviedo.
- 4) HOU, J. P., POOLE, J. W. (1969).-«Kinetics and Mechanism of Degradation of Ampicillin in Solution». Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 58, N.º 4, 447-454.
- 5) INDELICATO, J. M., NORVILLAS, T. T., WHEELER, W. J. (1972).-«Intramolecular Nucleophilic Attack in 7-α- Aminophenylacetamido-cephalosporin Esters». J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1.162.
- 6) JOHNSON, J. R., WOODWARD, R. B., ROBINSON, R. (1949).-«The Chemistry of Penicillin». P. 415, Princeton University Press.