

**REACCIONES DE DEGRADACION
DE ISOXAZOIL-PENICILINAS
I.—Cinética de formación de los ácidos penílico
y peniciloico en disolución ácida.**

*Por J. M. Calleja *
D. Ordóñez*

En disolución ácida las penicilinas se degradan a productos biológicamente inactivos, dependiendo la velocidad de degradación de la naturaleza de la cadena lateral. Esta sensibilidad al ataque electrofílico se manifiesta especialmente en el nitrógeno del anillo β -lactama, sufriendo inevitablemente una transformación a ácido penicilénico, el cual es sumamente inestable y rápidamente se isomeriza a ácido peniciloico y ácido penílico. La velocidad de formación relativa de los productos de degradación es una función del pH del medio para una estructura dada y resto de variables temperatura y fuerza iónica fijas.

Aunque han sido varios los estudios clínicos realizados en la serie homóloga de las isoxazoil-penicilinas (1 al 4), por el contrario, son escasos los trabajos encontrados concernientes al estudio de las mismas en disolución y particularmente en medio ácido. Por esta razón y dada la importancia que en la terapéutica por vía oral poseen estas penicilinas, creemos que este estudio está sobradamente justificado.

TECNICA EXPERIMENTAL

El ácido peniciloico producido por tratamiento de la penicilina con álcalis o por acción del enzima bacteriano penicilinasas, reduce el reactivo ácido arsenomolibdico- HgCl_2 descrito por PAN⁵ y NELSON⁶ a «azul arsenomolibdato», determinándose la absorción a $800 \text{ m}\mu$. El ácido penílico absorbe en un máximo de $235\text{-}237 \text{ m}\mu$ no desarrollando color con el reactivo de PAN. En todos nuestros

* Cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia.
Facultad de Farmacia. Santiago de Compostela.

experimentos las isoxazoil-penicilinas han sido degradadas en las mismas condiciones: concentración inicial $0,9 \cdot 10^{-3}$ M, temperaturas de 37,45 y 55°C, fuerza iónica 0,3 e intervalo de pH 1,0 a 4,0. Puesto que el radical de la cadena lateral unido al ácido 6-amino-penicilánico interfiere en la medida de la absorción en estas penicilinas, se ha seguido de forma general el siguiente procedimiento: A una muestra se le añade el reactivo arsenomolibdico- HgCl_2 y se determina la absorción del azul de molibdeno producido. Esta lectura es proporcional a la cantidad de ácido peniciloico presente. Otra muestra se trata con hidróxido sódico 10^{-2} M hasta que la reacción sea completa, aproximadamente treinta minutos. La lectura de la absorción da la medida del ácido peniciloico presente más el formado de la penicilina intacta. El ácido penílico se deduce por diferencia entre el ácido peniciloico + penicilina y la penicilina inicial. Las medidas colorimétricas se han realizado en un espectrofotómetro Unicam 500-SP y las penicilinas empleadas en su forma sódica tenían una pureza mínima del 98 % comprobada por valoración química y biológica. El resto de los reactivos empleados han sido de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como el resto de las penicilinas las isoxazoil-penicilinas se degradan en disolución ácida a temperatura, pH y fuerza iónica constante, según una reacción de primer orden, dependiendo la velocidad de la misma de la concentración de iones hidrógeno del medio. Esta dependencia no es lineal debido a su ionización, inactivándose globalmente de acuerdo a la expresión.

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{(a-x)}$$

donde a representa la penicilina que queda sin degradar al cabo de un tiempo t y x = ácido penílico + ácido peniciloico. Puesto que los dos isómeros inactivos se forman simultáneamente según la ecuación de primer orden

$$K = k_1 (\text{penílico}) + k_2 (\text{peniciloico})^1$$

Las curvas que representan la cinética típica para la formación de los productos de degradación en las tres penicilinas estudiadas se representan en la figura 1. Dado que la relación de los productos de degradación es constante con el tiempo

$$m = \frac{[\text{penílico}]}{[\text{peniciloico}]} = \frac{k_1}{k_2}^2 \text{ pueden calcularse fácilmente } k_1 \text{ y } K_2 \text{ a partir}$$

de los datos experimentales, teniendo en cuenta las expresiones (1) y (2).

$$\frac{K}{k_1} = 1 + \frac{1}{m}; \quad K = k_1 \frac{m+1}{m}; \quad k_1 = \frac{mK}{m+1}$$

$$\text{y} \quad \frac{K}{k_2} = m+1; \quad k_2 = \frac{K}{m+1}$$

Los valores de las constantes macroscópicas de degradación de la Oxacilina necesarios para cálculos posteriores han sido leídos de las curvas «catenarias» de estabilidad del trabajo de NIEN CHU⁸. Para la determinación de las constantes de degradación de la cloxacilina y dicloxacilina a distintas temperaturas, pH y $\mu = 0,3$ se ha conseguido el método de OERTENBLADT.⁹ Se trata a su vez de una modificación del método de ALICINIO¹⁰ y nos permite valorar prácticamente sin error el antibiótico activo en presencia de sus productos de degradación en todo el intervalo de pH. Los valores hallados en las condiciones de trabajo expresadas se hallan recogidos en la Tabla I.

TABLA I

pH	Temperatura = 37° C	$\mu = 0,3$	
	$K_{\text{Oxa.}} \text{ hr}^{-1}$	$K_{\text{clox.}} \text{ hr}^{-1}$	$K_{\text{diclox.}} \text{ hr}^{-1}$
1,45	1,20	0,887	0,518
2,00	0,380	0,316	0,247
	1,00	0,930 a	0,868 a
	1,48 b	1,41 b	1,35 b
2,35	0,206	0,150	0,138
3,86	0,160	0,134	0,110

Para el cálculo de las constantes macroscópicas se ha tenido en cuenta solamente el efecto catalítico general de los protones del medio, despreciándose los posibles efectos específicos de los ingredientes del bufer quienes por otra parte solamente podrían ser considerados por encima de pH 3,0. Las constantes de velocidad k_1 y k_2 a 37°C y $\mu = 0,3$ como una función del pH del medio, se hallan recogidas en la Tabla II para las tres penicilinas estudiadas.

Quando se representa gráficamente en escala semi-logarítmica la constante macroscópica ($K = k_1 + k_2$), k_1 y k_2 frente al pH del medio, se obtiene una velocidad comparativa entre ambas reacciones para las penicilinas estudiadas.

TABLA II

pH	Oxacilina		Cloxacilina		Dicloxacilina	
	$k_1 \cdot \text{hr}^{-1}$	$k_2 \cdot \text{hr}^{-1}$	$k_1 \cdot \text{hr}^{-1}$	$k_2 \cdot \text{hr}^{-1}$	$k_1 \cdot \text{hr}^{-1}$	$k_2 \cdot \text{hr}^{-1}$
1,45 a	0,700	0,500	0,425	0,462	0,164	0,384
2,00 b	0,230	0,150	0,168	0,148	0,101	0,146
2,35	0,124	0,081	0,082	0,068	0,067	0,071
3,86	0,093	0,064	0,078	0,056	0,051	0,060

a) bufer de ClH-ClNa. b) pH 2,00 — 3,86 bufer de «fosfatos»

Energía de activación.—La dependencia de la temperatura sobre la velocidad de degradación de las isoxazoil-penicilinas en medio ácido, se ha determinado para el isómero inactivo ácido penílico, midiendo las constantes de velocidad de formación de dicho isómero a pH = 2,00 a tres temperaturas 37,45 y 55°C y $\mu = 0,3$. La aplicación de la ecuación de ARRHENIU

$$\log k_1 = -\frac{\Delta H}{2,303 \cdot R} \times \frac{1}{T} + \log A$$

nos ha permitido calcular en cada caso el valor de ΔH de la representación gráfica de los k_1 frente a $1/T$. Estos valores deducidos de la figura 3 han sido Oxacilina $\Delta H = 17,4 \text{ Kcal. mol}^{-1}$, Cloxacilina $\Delta H = 18,7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ y Dicloxacilina $\Delta H = 19,7 \text{ Kcal mol}^{-1}$

La hidrólisis de la penicilina a ácido peniciloico transcurre con el ataque directo al enlace β -lactama por HOH. En la serie isoxazoílica la producción de ácido peniciloico alcanza en todos los casos niveles sensiblemente más bajos que los aportados por las penicilinas inestables en medio ácido. Sin embargo, la labilidad del anillo β -lactama dentro de la serie homóloga no parece estar influida por el cambio de polaridad producido en la cadena lateral por introducción de uno o dos átomos de cloro respectivamente en la molécula en las posiciones indicadas en la figura 4.

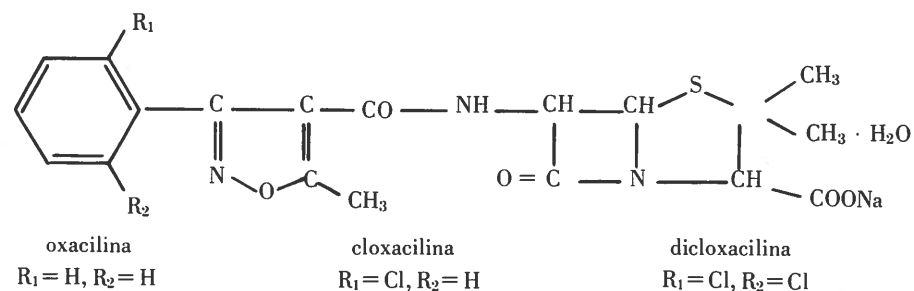


Figura 4

Una situación distinta es, sin embargo, la que afecta a la conversión de estas penicilinas a ácido penílico. Cuando se comparan los resultados obtenidos por nosotros con los obtenidos por otros autores ⁷ aún cuando se trate de penicilinas con diferentes cadenas laterales, se pone de manifiesto el bajo nivel de ácido penílico producido en la transformación de los tres primeros términos de la serie isoxazoílica, que llega a ser de diez a quince veces menor que el producido, por ejemplo, por la bencilpenicilina en las mismas condiciones experimentales. Dentro de la propia serie homóloga, la producción de ácido penílico está condicionada al número de átomos de cloro sustituidos en el radical isoxazoil—, aumentando la velocidad de formación del mismo en el orden dicloxacilina \rightarrow cloxacilina \rightarrow oxacilina. Estos resultados deberían esperarse si consideramos que en la formación de ácido penílico en medio ácido la reacción implica un reajuste intramolecular directo en el cual un enlace $C_1 - OH$ reacciona con un enlace $C_2 - N$ para dar $C_1 - N$ y $C_2 - OH$ en la figura 5.

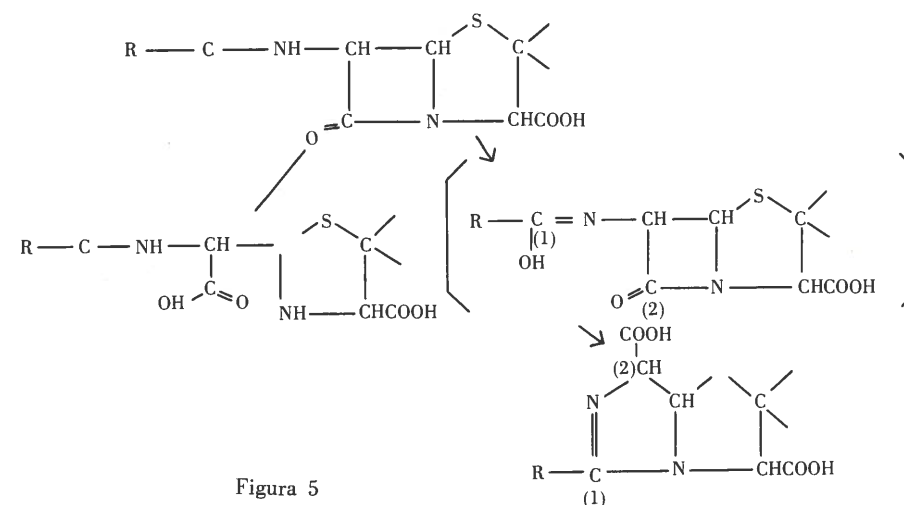
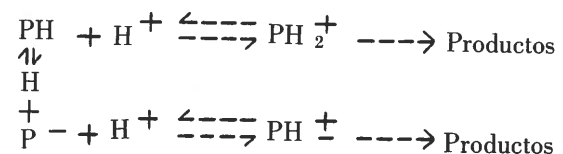


Figura 5

Esta supuesta reacción podría transcurrir a través de la forma electrométrica intermedia encerrada en el corchete; para la cual no están en contradicción las supuestas relaciones mutuas entre átomos y enlaces implicados en la misma. Si admitimos este modelo, la estabilidad debería variar con el efecto inductivo ($-I$) del sustituyente en las posiciones indicadas en la figura 4, siendo aproximadamente proporcional a la fuerza del ácido de la cadena lateral de la cual deriva la correspondiente penicilina, tal y como ha propuesto DOYLE.¹¹ Los valores hallados comprueban estas predicciones en las penicilinas ensayadas. La introducción de uno o dos átomos de cloro en el radical de la cadena lateral unido al ácido 6-amino-penicilánico, producen una disminución de la velocidad de formación del ácido pení-

lico en medio ácido. Cuando esta velocidad se estudia a pH-2,00, condiciones a las que corresponde aproximadamente la mayor formación relativa de ácido penílico, en función de la temperatura para los tres primeros términos de la serie y se calcula el valor de la energía de activación aparente en cada caso, se encuentra que estas energías siguen el orden oxacilina \longrightarrow cloxacilina \longrightarrow dicloxacilina, lo que está en perfecto acuerdo con la suposición de que la introducción de sustituyentes electronegativos en el radical de la cadena lateral impiden el desplazamiento de los electrones evitando de esta forma la iniciación de un reajuste hacia la forma isomérica biológicamente inactiva de ácido penílico. Es de señalar, no obstante, que aunque tanto los valores de las energías de activación a ácido penílico como los efectos estabilizantes de los átomos de cloro, tienen en la serie estudiada una indudable relación de secuencia; no se acusan diferencias sustanciales en el comportamiento cinético de los tres primeros términos de la serie en medio ácido. Otro aspecto de indudable interés es la vía de formación de este ácido penílico. SCHWARTZ¹² ha demostrado sobre la base de los resultados experimentales obtenidos por KREJCI¹³ que la degradación de la penicilina en disoluciones ácidas se caracteriza por dos reacciones paralelas cinéticamente equivalentes. La formación del ácido penicilínico la considera como resultado de la hidrólisis catalizada por ion hidrógeno del anión penicilinato o por el reajuste espontáneo del ácido penicilínico indisociado según el esquema siguiente:



En los resultados encontrados en la serie estudiada se observa un aumento de la velocidad de formación del ácido peniciloico cuando el pH desciende, lo que no supone en forma alguna que la velocidad de transformación a ácido peniciloico aumente cuanto mayor sea la concentración de iones hidrógeno del medio. Esto indica que el ácido penicilínico se forma de la molécula de penicilina de la manera que prevé SCHWARTZ a través del intermedio metastable y que ambos, el ácido penicilínico disociado y no disociado, se isomerizan a los dos productos biológicamente inactivos aunque evidentemente con diferente extensión. BUNGAARD¹⁴ ha sugerido recientemente, estudiando solamente los resultados obtenidos a partir del éster de la bencil-penicilina, que el intermedio metastable es un compuesto Oxazolona-tiazolidina de estructura altamente inestable y tal como habían previsto otros investigadores¹⁵ de existencia transitoria.

RESUMEN

Se ha estudiado la degradación en medio ácido de los tres primeros términos de la serie homóloga de las isoxazoilpenicilinas. Los valores de las constantes de formación de ácido peniciloico mostró en todos los casos valores sensiblemente iguales. Los valores de las constantes de velocidad de formación del ácido penílico se ha encontrado que varían con el número de átomos de cloro sustituidos en el radical de la cadena lateral unida al ácido 6-amino-penicilánico. Esta observación queda confirmada con los correspondientes valores de la energía de activación. Finalmente y en función de los resultados obtenidos se discute el mecanismo de transformación a los isómeros inactivos en medio ácido para las tres penicilinas estudiadas.

RESUME

On a étudié la dégradation des trois premiers termes de la série homologue des isoxazoilpénicillines dans un milieu acide. Les valeurs des constantes de formation d'acide pénicilloïque montrèrent, dans tous les cas, des valeurs sensiblement égales. On a trouvé que les valeurs des constantes de vitesse de formation d'acide pénicillique varient avec le nombre d'atomes de chlore substitués dans le radical de la chaîne latérale unie à l'acide 6-aminopénicillanique. Cette observation est confirmée par les valeurs correspondantes de l'énergie d'activation. Finalement, et d'après les résultats obtenus, on décrit le mécanisme de transformation en isomères inactifs dans un milieu acide pour les trois pénicillines étudiées.

SUMMARY

A study has been carried out on the degradation of the three first terms of the homologous series of isoxazoilpenicillins in an acid medium. The values of the constants of penicilloic acid formation were sensibly equal in all the cases. It has been found that the values of the constants of penicillid acid formation vary according to the number of chlorine atoms substituted in the radical of the side chain linked to the corresponding values of the activation energy. Finally, a discussion has been made on the mechanism of transformation into inactive isomers in an acid medium of the three penicillins studied.

BIBLIOGRAFIA

1. MURDOCH, J. MAC; SPIERS, C. F.; GREDDER, A. M. y WALLACE, E. T. *Brit. Med. J.* **2**, 1238 (1964).
2. KUNIN, C. M., *Clin. Pharmacol. Ther.* **7**, 166 (1966).
3. ABU-NASSAR, H. y WILLIAMS, J. W. *Amer. Chem. Sci.* **245**, 459 (1963).
4. SIERRA, M. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Año 1972.
5. PAN, S. C. *Analyt. Chem.* **26**, 1438 (1954).
6. NELSON, N. J. *Biol. Chem.* **153**, 373 (1944).
7. DENNEN, D. y DAVIS, W. W. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pág. 531 (1961).
8. NIEN CHU, CHAO FU-SUN y F. YIN-SHAN. *Acta Pharm. Sinica* **12**, 614 (1965).
9. OERTENBLADT, B. *Acta Chem. Scand.* **4**, 518 (1950).
10. ALICINO, J. F. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* **18**, 619 (1946).
11. DOYLE, F. P. y NAYLER, J. H. C. *Nature* **191**, 1091 (1961).
12. SCHWARTZ, M. A. J. *Pharm. Sci.* **54**, 472 (1965).
13. KREJCI, E. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **21**, 707 (1956).
14. BUNGAARD, H. J. *Pharm. Sci.* **60**, 1275 (1971).
15. CLARKE, H. T. JOHNSON, J. R. y ROBINSON, R. «*The Chemistry of Penicillin*». University Press. Princeton N. J. 1949.

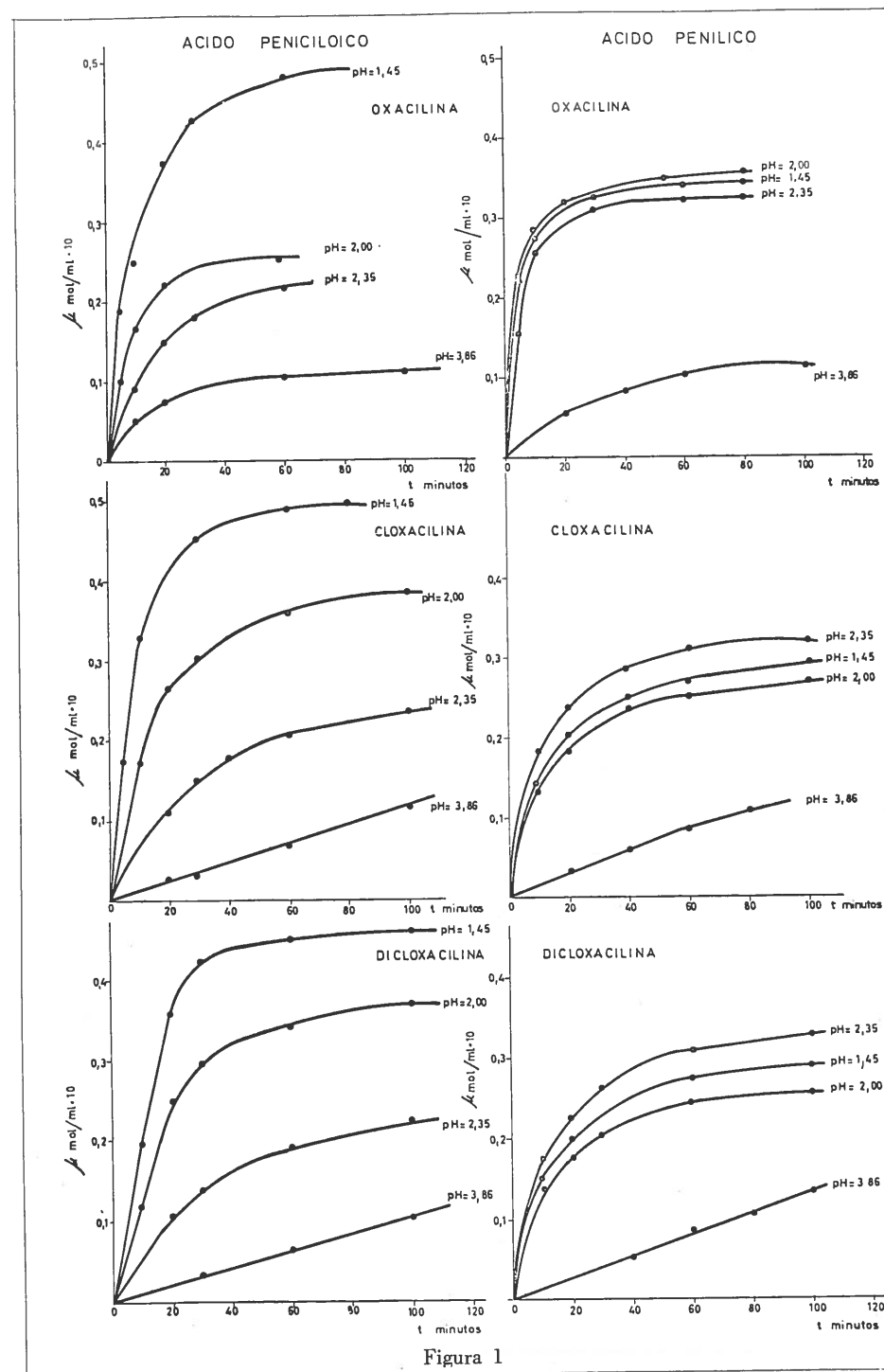


Figura 1

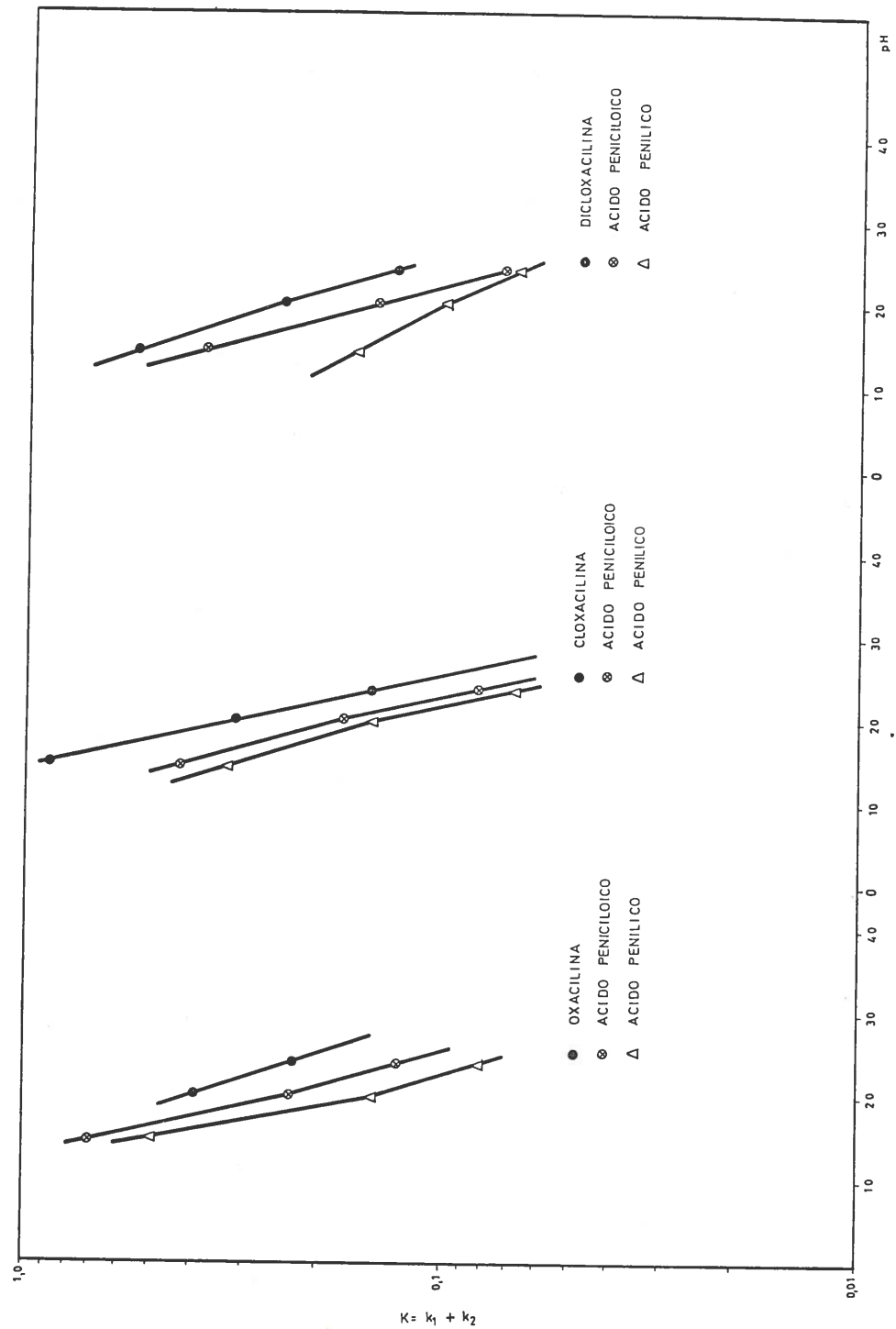


Figura 2

$K = k_1 + k_2$

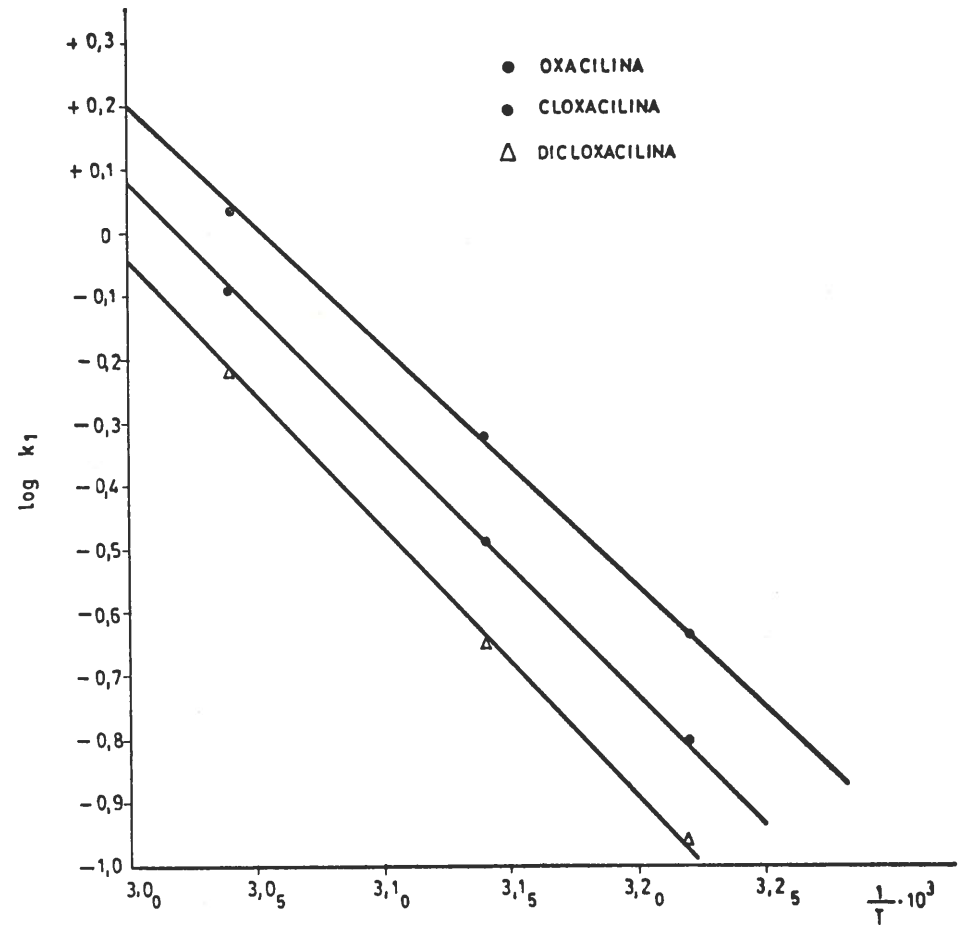


Figura 3