

DEPARTAMENTO DE FARMACIA GALENICA
DEPARTAMENTO DE ESTADISTICA
UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CINETICA DE DESCOMPOSICION DE LA CLOXACILINA SODICA APLICACION DE METODOS ESTADISTICOS AL TRATAMIENTO DE DATOS CINETICOS

Jiménez, M., Escalera, B., Martín, J.

RESUMEN

Se ha realizado un estudio cinético de la degradación de la cloxacilina sódica, usando para ello técnicas espectrofotométricas. El trabajo se completa con una revisión de métodos estadísticos aplicables al tratamiento de datos cinéticos.

SUMMARY

It has been realized a decomposed cinetic study about the least of cloxacilina sodic using espectrofotometryc tecnic. The work is complet with a stadistic method revision used for the cinetic researd.

INTRODUCCION

El término antibiótico se usa para designar un conjunto de sustancias químicas producidas por microorganismos que inhiben e incluso destruyen a otros microorganismos (1). Las penicilinas son uno de los antibióticos más usados. Con el nombre genérico de penicilinas se conocen una serie de ácidos fuertes monocarboxílicos producidos por varias especies de mohos del genero *Penicillium*. Químicamente las penicilinas son acilaminoderivados del ácido penicilánico, las cuales tienen un núcleo común, constituido por un doble anillo tiazolidin β -lactámico, llamado ácido 6-aminopenicilámico, al cual mediante unión peptídica se le une una cadena lateral, que diferencia a las distintas penicilinas. Las penicilinas semisintéticas se obtienen por la introducción de cadenas laterales en el ácido 6-aminopenicilámico,

aislado por distintas técnicas (2,3). La nueva serie de penicilinas semisintéticas obtenidas presentan mayor actividad y estabilidad que las naturales. Dentro de las penicilinas semisintéticas se encuentra el grupo de la isoxazolilpenicilinas, que son penicilinas de espectro medio resistentes a las penicilinasas, siendo una de las más usadas la cloxacilina sódica (6-(3-o-clorofenil-5-metilisoxazol-4-carboxamido penicilinato sódico). Estas penicilinas en disolución se degradan a formas biológicamente inactivas, siendo importante conocer su cinética de degradación ya que las isoxazolilpenicilinas se administran frecuentemente en disoluciones por vía oral y parenteral. Son numerosos los estudios de cinética de degradación de penicilinas por su gran empleo en terapéutica (4, 5, 6). En el presente trabajo se aborda el estudio de la cinética de degradación de la cloxacilina sódica. El trabajo se completa con una revisión de los distintos métodos estadísticos aplicables al tratamiento de datos cinéticos ya que cualquier estudio químico se debe completar con un análisis estadístico que nos indique la bondad de los resultados obtenidos. Así mismo es importante consignar el valor de los parámetros fisicoquímicos obtenidos experimentalmente aportando datos sobre el error con que se han medido, donde los ajustes de líneas rectas no solo se deben reseñar los valores de la pendiente y la ordenada o usar solo el coeficiente de correlación como criterio exclusivo de la bondad del ajuste, sino que es interesante realizar un análisis estadístico lo más completo posible sobre estos datos.

Para realizar el análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos en el laboratorio, es conveniente realizar en primer lugar un test de contraste de hipótesis para detectar errores sistemáticos durante la realización de las experiencias, además este tipo de test se puede utilizar para comparar valores de un mismo parámetro, y estudiar la precisión de los resultados. Posteriormente se intentan relacionar los datos por una regresión lineal cuyo análisis estadístico puede proporcionarnos valiosa información de parámetros químicos como el orden de una reacción en cinética química o la relación entre la absorbancia y la concentración en espectrofotometría. A veces no es posible linealizar una expresión para calcular ciertos parámetros químicos por lo que hay que utilizar métodos de optimización no lineales, así por ejemplo para calcular los parámetros de la ecuación cinética de algunas reacciones hay que utilizar ecuaciones no lineales. Por último y para comparar resultados obtenidos en el laboratorio, con los de otros investigadores se suele emplear otros contrastes de hipótesis.

MATERIAL Y METODOS

La instrumentación usada fue: Espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer Lambda 5, potenciómetro Radiometer pH-M-64, termostato Selecta $\pm 0,1^\circ\text{C}$, ordenador Amstrad PC1640CD.

La cloxacilina sódica fue suministrado por Antibióticos S.A., con una pureza superior al 99%.

El método usado para la determinación espectrofotométrica fue el de Bungeard (7) y el estudio cinético se realizó por técnicas usuales.

RESULTADOS Y DISCUSION

CINETICA DE DEGRADACION DE LA CLOXACILINA SODICA

La forma mercaptada de la cloxacilina sódica presenta un máximo de absorción a 343 nm en el cual se han realizado todas las medidas. En la figura 1 se muestra la gráfica de calibrado obtenida para distintas concentraciones, donde se puede observar el estricto cumplimiento de la ley de Lamber-Beer entre $2'04 \cdot 10^{-5}M$ y $1'53 \cdot 10^{-4}M$. El valor de la absorbitividad molar, a la longitud de onda de 343 nm, fue de $4901'77 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$.

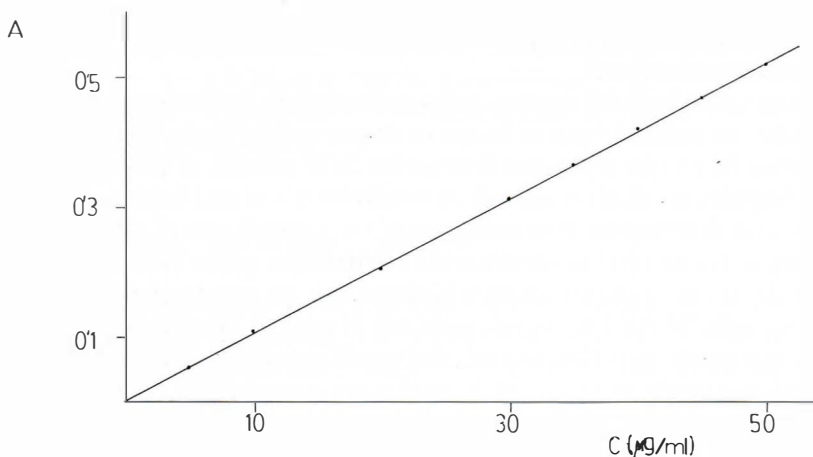


Fig. 1. Cumplimiento de la ley de Lamber-Beer por la cloxacilina sódica.

Para realizar el estudio cinético se ajustó la fuerza iónica del medio a 0,2, por adición de ClK. El proceso de degradación se realiza siguiendo una cinética de orden uno. De los resultados obtenidos se deduce que la constante de velocidad disminuye al aumentar el pH, siendo más estable a pH próximos a la neutralidad. Esta variación de la velocidad de descomposición con el pH sugiere que se descompone siguiendo un mecanismo de catálisis ácida específica.

El estudio del efecto de la temperatura indica un aumento en la velocidad de degradación al aumentar la temperatura. Se han calculado el valor de la energía de

activación por la ecuación de Arrhenius obteniéndose unos valores entre 7'2 y 13'7 Kcal/mol, dependiendo del pH (2'4-5'6).

Se ha estudiado la influencia del disolvente sobre la velocidad de descomposición observándose que la cloxacilina sódica es más estable en medios hidroalcohólicos (metanol, etanol y propanol) siendo más estable cuanto mayor es la concentración de alcohol en el medio.

APLICACION DE METODOS ESTADISTICOS AL TRATAMIENTO DE DATOS CINETICOS

Contraste de hipótesis

Es conveniente disponer de una metodología estadística durante la recogida de resultados en un experimento, que nos indique si cometemos errores sistemáticos, si existe alguna medida que deba de ser rechazada o si es significativa la influencia de algún factor determinado en el proceso químico estudiado. Para estos casos se puede emplear los test de contraste de hipótesis (8) los cuales efectúan una inferencia inductiva que aunque inexacta permite medir el grado de incertidumbre expresándolo en forma de probabilidad.

En la sistemática del empleo de los contrastes de hipótesis se formulan dos hipótesis: una nula (H_0) que es la que se desea verificar y otra llamada hipótesis alternativa (H_1) y que representa la negación de la primera. A partir de los datos experimentales se calcula el valor de un estadístico (t'), el cual tiene una función de distribución determinada. Este parámetro (t') se compara con el valor teórico del estadístico (t) a un nivel de significación determinado, que se encuentra tabulado, donde si t' es menor que t se acepta la hipótesis nula, en caso contrario se rechaza la hipótesis nula. El nivel de significación (α) lo elige el investigador teniendo en cuenta que cuanto menor sea este más fácilmente se puede rechazar como falsa una hipótesis que puede ser verdadera. Normalmente se toma el 5%, nivel de significación que se considera óptimo para no rechazar una hipótesis verdadera y no aceptar una falsa. En todos los test de hipótesis hay que tener en cuenta el número de puntos experimentales así como el nivel de riesgo que se este dispuesto a correr para rechazar una hipótesis verdadera y no rechazar una hipótesis falsa (9).

Considerando que la variable se distribuyen como una normal se indican a continuación algunos test de hipótesis utilizables en el estudio de reacciones químicas.

1. Test de compatibilidad de un valor obtenido con otro considerado verdadero

Si obtenemos por medición experimental un valor medio de un determinado parámetro químico (x) y queremos ver si es compatible con el valor medio del

mismo parámetro obtenido por otro investigador (x'), en primer lugar establecemos como hipótesis nula (H_0) que $x = x'$, es decir que nuestro valor medio coincida con el obtenido por el otro investigador y como hipótesis alternativa (H_1) que no coincida, esto es $x \neq x'$, por tanto

$$\begin{aligned} H_0 &: x = x' \\ H_1 &: x \neq x' \end{aligned}$$

En segundo lugar hay que calcular t' , el cual se distribuye según una función t de Studen con f grados de libertad (que se definen como la diferencia entre el número de valores experimentales y el número de parámetros estimados). Matemáticamente se puede demostrar que t' viene dada por la ecuación

$$t' = \frac{|x - x'|}{\sigma}$$

siendo σ la desviación típica de x . Una vez calculado el valor de t' se obtiene el valor de t para un determinado valor de significación ($\alpha = 0,05$) y para f grados de libertad, valor que viene en tablas estadísticas. Comparando los valores obtenidos tenemos que si $t' > t(f, 0,05)$ se rechaza la hipótesis nula H_0 , pero si $t' < t(f, 0,05)$ se acepta H_0 , es decir se acepta que el valor experimental obtenido x es igual al dato obtenido por otro investigador x' (10).

2. Test para rechazar una medida experimental

Cuando en el laboratorio se realizan varias medidas de una misma magnitud a veces es conveniente rechazar algunas de ellas, por lo que es útil disponer de un método matemático que nos de el criterio para poder conocer que valores deben aceptarse y cuales rechazarse. Un buen procedimiento de carácter general puede ser el siguiente test de hipótesis. Si tenemos n medidas con un valor medio x y una desviación típica σ , para determinar si una determinada medida x_i se puede rechazar o no, se toma como hipótesis nula, H_0 , que el valor x_i no se debe rechazar y como hipótesis alternativa, H_1 , que se debe rechazar, esto es

$$\begin{aligned} H_0 &: x_i \text{ no debe de rechazarse} \\ H_1 &: x_i \text{ debe de rechazarse} \end{aligned}$$

A continuación se calcula la variable r_i que viene dada por la ecuación

$$r_i = \frac{|x_i - x|}{\sigma \cdot \sqrt{f_i/n}}$$

la cual tiene como distribución marginal la distribución r de Arley con $fi = f - 1$ grados de libertad. Entonces comparando el valor de ri con el de r tabulado para fi grados de libertad y para un nivel de riesgo, que en este ensayo se suele tomar el 1% ($\alpha = 0.01$), de riesgo α se tiene que si $r_i > r(fi, \alpha)$ no debe de rechazarse este valor, es decir se acepta la hipótesis nula (11).

$$r_i > r (f_i, \alpha)$$

3. Test de compatibilidad de una nueva medida con otras ya realizadas

A veces es interesante detectar errores en el método utilizado para obtener los valores experimentales, como pueden ser errores en la preparación de disoluciones o desajustes en el aparataje de medida, por esto cuando realizamos una medida de un parámetro químico x y pasado algún tiempo obtenemos una nueva medida del mismo parámetro x' podemos comprobar si el nuevo valor obtenido es comparable al medido previamente, es decir si esta nueva medida está realizada en las mismas condiciones experimentales que las anteriores o si por el contrario han existido modificaciones en las condiciones de medición. Para comprobar esto se puede realizar un test contraste de hipótesis donde la hipótesis nula, H_0 , será que x' sea igual a x y la alternativa que no lo sea, es decir

$$H_0 : x' = x$$

$$H_1 : x' \neq x$$

A continuación calculamos t' por la ecuación

$$t' = \frac{|x_i - x'|}{\sigma \cdot \sqrt{1 + 1/n}}$$

la cual se distribuye como una t de Studen con f grados de libertad. Comparando el valor de t' obtenido con el tabulado t para f grados de libertad y para un nivel de significación α que suele ser del 5%, es decir $\alpha = 0.05$, se obtiene que si $t' < t(f, 0.05)$ entonces x y x' son compatibles, es decir se acepta la hipótesis alternativa H_1 , si $t' > t(f, 0.05)$.

4. Test de compatibilidad de varianzas

Cuando queremos saber si dos parámetros fueron medidos con la misma precisión se usa un test donde como hipótesis nula se supone que el cuadrado de las

varianzas de los dos parámetros son iguales y como hipótesis alternativa que no lo son, esto es

$$\begin{aligned} H_0 &: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H_1 &: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \end{aligned}$$

Si definimos la variable F' como

$$F' = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad \text{o como } F' = \frac{\sigma_2^2}{\sigma_1^2} \quad \text{si } \sigma_1^2 < \sigma_2^2$$

se puede demostrar que se distribuye como una F de Snedecor con f_1 y f_2 grados de libertad. Comparando el valor de F' obtenido con el de la F de Snedecor tabulada podemos decir que si $F' < F(f_1, f_2, 0.05)$ se acepta la hipótesis nula H_0 , pero si $F' > F(f_1, f_2, 0.05)$ se rechaza H_0 y se acepta la hipótesis alternativa. Cuando $\sigma_2^2 > \sigma_1^2$, F' se compara con $F(f_2, f_1, 0.05)$.

Regresiones lineales

Al analizar los datos obtenidos en cualquier experiencia química es frecuente encontrar con que existen correlaciones lineales entre las variables estudiadas. Con frecuencia y de forma rutinaria se aplica el método de mínimos cuadrados para obtener el valor de la pendiente y de la ordenada en el origen. En el análisis lineal hay que estimar hasta qué punto la regresión obtenida es una buena aproximación de los datos experimentales así como los valores óptimos de los parámetros de regresión, siendo los mejores estimadores de a y b los que minimizan la suma de los cuadrados, en el metodología de los mínimos cuadrados.

Algunos autores (12) han indicado que usar solamente el coeficiente de correlación r como criterio exclusivo de la bondad del ajuste no es correcto, siendo incorrecto decir que un $r > 0.99$ indica un excelente ajuste, ya que el coeficiente de correlación se encuentra relacionado con el coeficiente b en una recta del tipo $y = a + bx$, de lo que se deduce que cuando b sea nula r también lo será aunque los puntos caigan todos sobre la recta. Por tanto no se puede conocer la correlación entre x e y solo por el valor de r sino que habrá que utilizar otros criterios estadísticos. Este problema se resuelve una vez efectuado el ajuste por mínimos cuadrados, con un análisis de la varianza (ANOVA), en el cual se distribuye la suma de los cuadrados de las desviaciones de los valores de la variable dependiente y de su media (13). El grado de correlación entre x e y se obtiene comparando el valor de F calculado con el de la F de Snedecor tabulado donde si el valor de F es cuatro veces el de la F de Snedecor para el nivel de riesgo elegido, se considera que la ecuación de correlación x e y obtenida interpreta satisfactoriamente los datos experimentales.

Ajustes no lineales

Cuando los datos no se ajusta a una ecuación lineal hay que buscar métodos de correlación no lineales. Para ello se conocen métodos de optimización no lineales generales y otros para cuando sólo sea necesario estimar un parámetro (14, 15). El problema estriba en resolver sistemas de ecuaciones que por su complejidad precisan métodos iterativos, los cuales normalmente se resuelven utilizando programas de cálculo en ordenador (16).

BIBLIOGRAFIA

- (1) WASKSMAN, S., *Science*, 110, 27, (1949).
- (2) BATCHELOR, F.R. and COL., *Nature*, 183, 257, (1959).
- (3) SEHEHAM, J.C., FERRIS, J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 2912 (1959).
- (4) SACANI, R., *Bull. Chem. Farm.*, 107, 640, (1968).
- (5) SCHARTZ M.A., y COL., *J. Pharm. Sci.*, 51, 149, (1962).
- (6) CHAPHAN, P.C., *J. Pharma. Sci.*, 165, 126, (1950).
- (7) BUNDGAARD H., ILVER, K., *J. Pharm. Pharmac.*, 24, 790, (1972).
- (8) NEYMAN Y PEARSON, *Biometrika*, 20 A, (1928).
- (9) GREEN J.R., MARGERISON, D., *Statistical Treatment of Experimental Data*, Elsevier, Amsterdam (1979).
- (10) NORTES, A., *Estadística Teórica y Aplicada*, Ed. Sol, Barcelona, (1987).
- (11) SPRIDONOV V.P., *Tratamiento Matemático de Datos Físicoquímicos*, Ed. Mir, Moscú, (1979).
- (12) DAVIES W.H., Pryor W.A., *J. Chem. Educ.*, 53, 285, (1976).
- (13) DRAPPER N.R., *Applied Regression Analysis*, John Wiley & Sons, New York, (1966).
- (14) JOHNSTON, J., *Econometric Methodos*, McGraw-Hill, (1975).
- (15) DIXON, L.C., *Non Linear Optimization*, English University Press, Glasgow, (1972).
- (16) WENTWORTH, W.E., *J. Chem. Educ.*, 42, 96 (1965).