

ESTUDIO *IN SITU* POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER, DEL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA AZITROMICINA EN MEZCLAS ACETONITRILLO/AGUA

IN SITU FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY STUDIES OF THE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF AZITHROMYCIN IN ACETONITRILE/WATER MIXES

Reynaldo Ortiz*, Gaudy Alizo, Yris Martínez, Elkis Weinhold

Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, Laboratorio de Electroquímica, Merida-Venezuela.
reynaldoluis@gmail.com

Recibido: 01-08-20

Aceptado: 01-10-20

Resumen

Se realizó un estudio voltamétrico y espectroelectroquímico *in situ* de la Azitromicina en medio orgánico, con el fin de contribuir a la elucidación del mecanismo de la oxidación anódica del sistema, tomando en cuenta la influencia de la presencia de agua en el mismo. Los estudios voltamétricos confirman que la oxidación electroquímica de la Azitromicina involucra procesos mixtos que influyen sobre la reacción de transferencia electrónica pura. El seguimiento *in situ* con espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), en la modalidad SNIPTIR, junto con las observaciones voltamétricas, permiten proponer un mecanismo de oxidación que involucra la transformación simultánea de los grupos metilos que sustituyen a los átomos de nitrógeno en la estructura del antibiótico y la formación de un ion iminio. La presencia de agua en el sistema desfavorece la oxidación de la Azitromicina y favorece la hidrólisis del grupo éster de su estructura.

Palabras claves: Azitromicina, Espectroelectroquímica, Oxidación, Antibiótico macrólido, FTIR, SNIPTIR

Abstract

Voltammetric and *in situ* Spectroelectrochemical study was performed, in order to contribute to the elucidation of the mechanism of anodic oxidation of Azithromycin in organic medium, taking into account the influence of the presence of water in this medium. Voltammetric studies confirm that the electrochemical oxidation of Azithromycin involves a mix process that affects the pure electron transfer reaction. The *in situ* monitoring with Fourier transform infrared spectroscopy, in the SNIPTIR mode, assisted by voltammetric observations, allows the suggestion of an oxidation mechanism that involves the simultaneous transformation of methyl groups present in the nitrogen atoms of the antibiotic structure, and the formation of an iminium ion. The presence of water inhibits the oxidation of Azithromycin, favoring the hydrolysis of the ester group within the Azithromycin structure.

Keywords: Azithromycin, Spectroelectrochemistry, Oxidation, Macrolide antibiotic, FTIR, SNIPTIR

Reynaldo Ortiz: Dr en Química Aplicada, opción Electroquímica (ULA), Lcdo. en Química (ULA), investigador de la Facultad de Ciencias-ULA Merida-Venezuela. **Email:** reynaldoluis@gmail.com. **Gaudy Alizo:** Lcda. en Química Universidad de Los Andes Merida-Venezuela. **Email:** gaudyalizo@gmail.com. **Yris Martínez:** Dra en Química Aplicada, opción Electroquímica (ULA), Licenciada en Química (ULA), miembro del personal docente y de investigación de la Facultad de Ciencias-ULA Merida-Venezuela. **Email:** ymartin@ula.ve. **Elkis Weinhold:** Dra en Química Aplicada, opción Electroquímica (ULA), Licenciada en Química (ULA), miembro del personal docente y de investigación de la Facultad de Ciencias – ULA. Merida-Venezuela. **Email:** elkisweinhold@gmail.com.

Introducción

La Azitromicina es un antibiótico macrólido^[1] que actúa contra una amplia gama de bacterias grampositivas y gramnegativas, es un azamacrólido semisintético de 15 miembros que es comúnmente prescrito para el tratamiento de bacterias que causan infecciones en el tracto respiratorio, mucosas y enfermedades de transmisión sexual, mostrando un bajo índice de efectos colaterales en relación a otros antibióticos^[2, 3, 4], más recientemente se ha reportado su efectividad para el tratamiento farmacológico en la enfermedad COVID-19, producida por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2^[5].

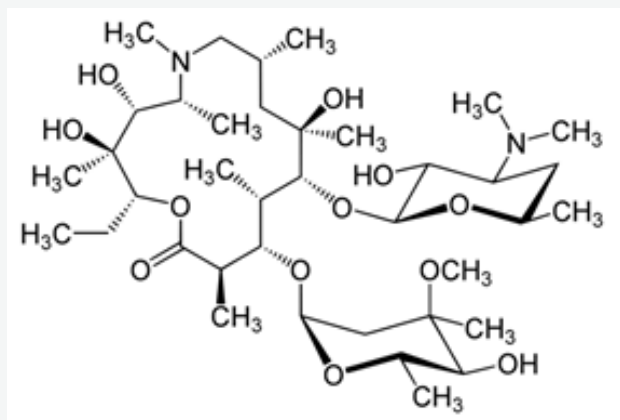


Figura 1.- Estructura de la Azitromicina

Adicionalmente, la Azitromicina está dentro de la clasificación de micro-contaminantes emergentes (EMPs) en agua^[6], por lo cual, es necesario desarrollar métodos para su remoción química, electroquímica o biológica. Por estas razones, se han venido desarrollando una gran cantidad de estudios farmacocinéticos^[7,8] y de comportamiento químico que permiten la elucidación de su comportamiento in vitro e in vivo; algunos de éstos, incluyen métodos cromatográficos^[9,10], espectrofotométricos^[11] y electroquímicos^[12-20]. Desde el punto de vista electroquímico, la Azitromicina es susceptible a reacciones de oxidación; Mandić, Z. y col.^[6] estudiaron por voltametría cíclica y electrólisis a escala preparativa, el proceso de oxidación electroquímica de la Azitromicina y sus

derivados en medio metanólico. Utilizando un electrodo de carbón vítreo (GCE) como electrodo de trabajo, estos autores reportan que la Azitromicina experimenta una reacción de oxidación irreversible con la formación de un catión radical como intermediario. Proponiendo un mecanismo consistente en una reacción química interpuesta entre dos etapas de transferencia de carga (EQE). Los autores indican que la oxidación de la Azitromicina comienza con la transferencia electrónica irreversible de un electrón para convertir ambos grupos amino en un catión radical (I). Luego, el catión radical extrae un átomo de H del solvente o del agua residual para producir la sal de Azitromicina (II). En este punto, la carga positiva en el nitrógeno inhibe la oxidación electroquímica por lo que de forma simultánea se produce una desmetilación que promueve la formación de una amina secundaria. De acuerdo a esto, la liberación del grupo metilo se puede originar por extracción de un protón alfa (III) para generar una enamina como intermediario (IV) que al reaccionar con el agua del medio o hidrogeno del solvente, forma una amina secundaria y un aldehído (V).

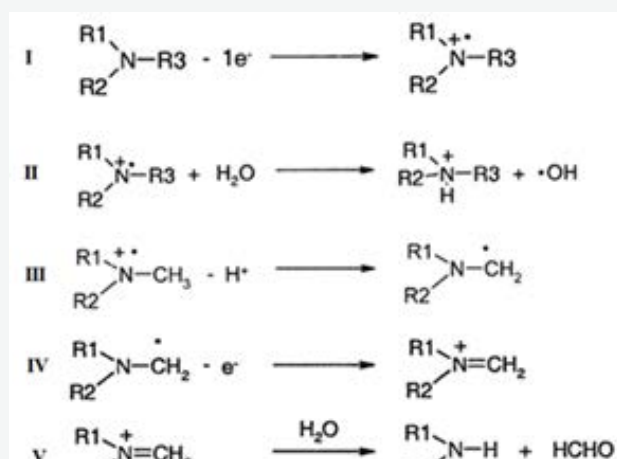


Figura 2.- Mecanismo de oxidación de Azitromicina, propuesto por Mandić, Z. y col^[6].

Donde R1 y R2 son los fragmentos de molécula que rodean los grupos amino, R3 es -H o -CH₃.

Komorsky-Lovrić, Š. y colaboradores^[13] reportaron la oxidación irreversible de la Azitromicina por voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada, en medio acuoso, utilizando NaClO₄ como electrolito

soporte en una ventana de potencial entre 0 y 1,2 V y una velocidad de barrido de 100 mV/s. La respuesta electroquímica de la Azitromicina revela una corriente de pico anódica a 0,936 V.

Wu, Y. y col. ^[15] estudiaron la oxidación electroquímica de la Azitromicina utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con una superficie de nanotubos de carbono multi pared (MWNT), como electrodo de trabajo, y como electrolito soporte un buffer fosfato (pH= 7). Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la Azitromicina es protonada tanto en el nitrógeno presente en la macrolactona como en el nitrógeno de la desosamina, dado que, de los grupos funcionales presentes en la estructura, el grupo amino es el que se puede oxidar con mayor facilidad.

J. Araujo y colaboradores ^[16], realizaron un estudio comparativo por voltametría de pulso diferencial y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, en la determinación del antibiótico Azitromicina en dos formulaciones farmacéuticas diferentes (cápsulas y suspensión). Estos autores reportan un estudio previo del sistema que contiene un electrodo de platino sumergido en una solución de Azitromicina 1×10^{-3} M en 0,1 M $\text{Bu}_4\text{NF}_6\text{P}/\text{CH}_3\text{CN}$, donde utilizan voltametría cíclica en un intervalo de potencial desde 200 a 900 mV y una velocidad de barrido de 100 mV/s. La respuesta obtenida durante el proceso, muestra el comportamiento típico para una reacción de oxidación irreversible, observando una corriente de pico anódica a 760 mV la cual atribuyen a la oxidación de los grupos aminos presentes en la estructura.

Peng, J. y col. ^[17] en 2011, plantearon un método voltamétrico para la determinación de Azitromicina en medio acuoso, modificando la superficie del electrodo de carbón vítreo con 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BMIMPF_6) sobre grafeno (Gr). En este trabajo se encontró que la Azitromicina experimenta un proceso de oxidación irreversible y que constituye un proceso controlado por adsorción al aumentar la velocidad de barrido desde 0,02 a 0,3 V/s. La voltametría cíclica reveló que

la modificación realizada sobre el electrodo de trabajo puede mejorar notablemente la actividad electrocatalítica de la oxidación de Azitromicina en soluciones neutras, permitiendo de esta manera, el desarrollo de un sensor voltamétrico simple, estable y sensible para la determinación de Azitromicina en formulaciones comerciales.

En el área de electroquímica, se han desarrollado numerosos métodos voltamétricos que han permitido estudiar el comportamiento electroquímico de la Azitromicina y proponer posibles mecanismos de oxidación, en medio acuoso y en medio orgánico. No obstante, es de especial interés implementar técnicas de análisis complementarias que permitan tener una visión más completa del proceso. La Espectroelectroquímica, ha demostrado ser una herramienta accesible y viable para realizar análisis directos y rápidos sobre mecanismos de reacción, suministrando información electroquímica y espectral del proceso generado en la superficie del electrodo observado. El objetivo de la presente investigación, fue estudiar mediante la técnica Espectroelectroquímica de infrarrojo con transformada de Fourier *in situ*, la oxidación electroquímica de la Azitromicina en mezclas de Acetonitrilo y agua sobre un electrodo de Pt.

Parte experimental

Todos los arreglos instrumentales y equipos utilizados en esta investigación, han sido reportados en trabajos anteriores ^[21-23], se emplearon reactivos de alta pureza sin purificación previa y agua ultrapura de $18 \text{ M}\Omega$ de conductividad. Los electrodos de Platino y Plata fueron de la marca Alfa Aesar de 99,9 y 99,99 % de pureza respectivamente.

Celdas y electrodos

Se utilizaron celdas construidas en vidrio de un solo compartimento y tres electrodos. Como electrodo de trabajo se usó un disco de platino de 1 cm^2 de área geométrica empotrado en un tubo de vidrio PYREX, como auxiliar se empleó un alambre de platino en forma de espiral y como electrodo de referencia (ER) se empleó un alambre de

plata sumergido en una solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0,01M en Acetonitrilo.

Estudios electroquímicos

Se realizó una evaluación previa del sistema electroquímico mediante voltametría cíclica utilizando una solución de Azitromicina 0,1 M y una solución de $\text{LiClO}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$ 0,1 M como electrolito soporte, con el propósito de establecer las condiciones óptimas para este trabajo. Adicionalmente, se realizó un estudio manteniendo constante la concentración de Azitromicina e incrementando la velocidad de barrido con la finalidad de obtener información cinética del proceso de oxidación.

Finalmente, se estudió el efecto del agua sobre la respuesta electroquímica del antibiótico. Para ello, se incrementó la cantidad de agua entre 4, 8, 12 y 18 %. La ventana de potencial usada en todos los experimentos fue de -0,4 a 1,8 V y la velocidad de barrido de 100 mV/s.

Estudios electroquímicos en película delgada

Para estos estudios, las medidas fueron tomadas sobre soluciones de Azitromicina 0,1 M. Se usó una celda con el diseño adecuado para formar una película delgada entre la superficie del electrodo de platino y la ventana de seleniuro de zinc, presionando el electrodo contra dicha ventana. El intervalo de potencial se estableció entre 0,4 y 1,4 V de acuerdo a la respuesta de oxidación que mostró el fármaco en los estudios voltamétricos. La velocidad de barrido se registró a 5 mV/s.

Estudios de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier por transmisión

Previo al estudio espectroelectroquímico, se realizó un análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier por transmisión, con el objetivo de identificar las bandas características del antibiótico estudiado, al igual que las señales de adsorción correspondientes a los compuestos utilizados como medio electrolítico. Los espectros fueron tomados

en una región espectral de 900 a 4000 cm^{-1} promediando 5 interferogramas, utilizando un detector DTGS. Se adquirió el espectro de la Azitromicina disuelta en Acetonitrilo a una concentración de 0,1 M, para conocer el valor de número de onda al cual absorben los distintos grupos funcionales de este macrolido en ese medio.

Estudios por Espectroscopía IRTF *in situ*

Se empleó la técnica SNIFTIR^[21-23], variando el potencial del electrodo de trabajo mediante escalones de potencial. Se estudió la región espectral de 500 a 4000 cm^{-1} , utilizando un haz polarizado p y una resolución espectral de 8 cm^{-1} . Los espectros fueron obtenidos a partir de una solución de Azitromicina 0,1 M realizando barridos interferométricos sucesivos, consistentes en un promedio de 100 interferogramas. La ventana de potencial analizada correspondió al intervalo de potencial establecido en la voltametría de película delgada y el potencial de referencia empleado para las medidas de reflectancia fue de 0,4 V utilizando un programa de pulso de escalón de potencial a cada 0,2 V, tomando cada espectro absoluto como el valor de la reflectancia a cada potencial de muestreo, $R_{(EM)}$, y el primero de la serie como de referencia $R_{(ER)}$, así se define como variación normalizada de reflectividad:

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_{(EM)} - R_{(ER)}}{R_{(ER)}} = \frac{R_{(EM)}}{R_{(ER)}} - 1$$

y los espectros se representan como una gráfica de $\Delta R/R$ vs número de onda.

Resultados y discusión

Estudios electroquímicos de la oxidación de la Azitromicina Evaluación del sistema electroquímico

En la figura 3A, se muestra el voltagrama cíclico de un electrodo de platino en una solución de Azitromicina 0,1 mol/L en $\text{LiClO}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$ 0,1 M a una velocidad de barrido de 100 mV/s y en una ventana de potencial desde -0,4 hasta 1,8 V (vs Ag/Ag^+).

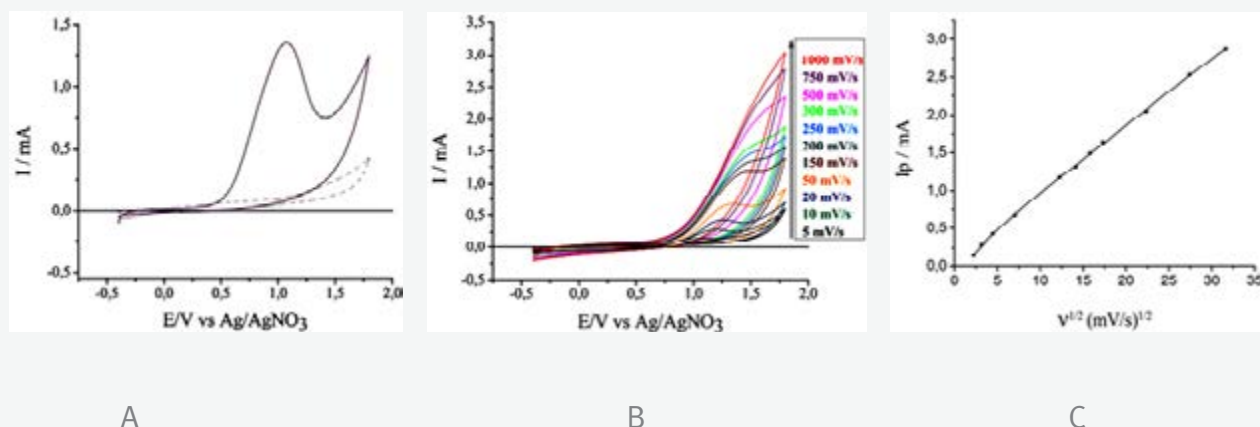


Figura 3. A) Respuesta voltamétrica del electrodo de platino en solución de Azitromicina 0,1 M. Velocidad de barrido: 100 mV/s. La línea cortada representa la respuesta del electrolito soporte en ausencia de Azitromicina. B) Respuesta voltamétrica del electrodo de platino en una solución de Azitromicina 0,1M. Velocidad de barrido: 5; 10; 20; 50; 150; 200; 250; 300; 500; 750 y 1000 mV/s y C) Variación de la intensidad de corriente pico (I_p) en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$) para la oxidación de Azitromicina 0,1 M.

Como puede observarse de la figura 3A, la oxidación anódica de la Azitromicina en este medio produce un pico entre 0,75 y 1,25 V vs Ag/AgNO₃. Este comportamiento fue reportado por Mandić y colaboradores [12] en un medio metanólico, ellos atribuyeron la formación de este pico a la oxidación de los grupos aminos terciarios presentes en la estructura. El aumento en corriente que se observa en esa misma figura, a potenciales mayores de 1,5 V probablemente, es causado por la descomposición del medio electrolítico. De igual manera, puede apreciarse que en la ventana de potencial establecida, el electrolito soporte presenta buena conductividad eléctrica y no exhibe señales asociadas a transferencias electrónicas que puedan interferir con el proceso de oxidación estudiado.

En la voltametría cíclica del antibiótico no se observan picos de reducción en el barrido inverso incluso a distintas velocidades de barrido (5 – 1000 mV/s) indicando la naturaleza totalmente irreversible de la oxidación de la Azitromicina (figura 3B).

Cuando se aumenta la velocidad de barrido, en el sistema se aprecia un incremento en la intensidad de corriente de pico y un ligero desplazamiento de los potenciales de pico anódico. El incremento en la intensidad de

corriente se debe al aumento del flujo de especies reaccionantes hacia la superficie del electrodo al aplicar una velocidad de barrido cada vez mayor y el ligero desplazamiento hacia potenciales más positivos, en el potencial de pico, indica que el proceso de transferencia electrónica es lento [23].

Adicionalmente, se grafica (figura 3B) la intensidad de corriente de pico (I_p) como una función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$), para estudiar el proceso de oxidación de la Azitromicina de manera cualitativa, encontrándose una variación cuasi lineal con coeficiente de regresión lineal de 0,9935 y un corte en el eje de ordenadas distinto de cero; esto sugiere, que la oxidación electroquímica de la Azitromicina involucra procesos mixtos que influyen sobre la reacción de transferencia electrónica pura [23].

Estudios electroquímicos en película delgada de la oxidación de la Azitromicina

Los estudios electroquímicos en película delgada se realizaron bajo las condiciones a emplearse en los análisis espectroelectroquímicos. Este sistema consistió de una celda con una ventana transparente al infrarrojo, solución electrolítica en película delgada y bajas

velocidades de barrido.

En La figura 4, se observa la respuesta voltamétrica a una velocidad de barrido de 5 mV/s, del mismo sistema en estudio, pero en este caso el estudio es realizado en película delgada de la solución de Azitromicina 0,1 M formada entre el electrodo de platino y la ventana de seleniuro de zinc. En rasgos generales, se puede decir que el comportamiento se mantiene y la señal atribuida a la oxidación irreversible de la Azitromicina se observa entre 0,8 y 1,0 V. La diferencia en la respuesta electroquímica obtenida en este estudio con respecto a los estudios electroquímicos anteriores (respuesta voltamétrica a 5 mV/s figura 3B), es consecuencia de un proceso de difusión restringido debido al diseño de celda, la disposición de los electrodos en estos experimentos, hacen que la caída IR sea mayor que en condiciones de difusión lineal semiinfinita.

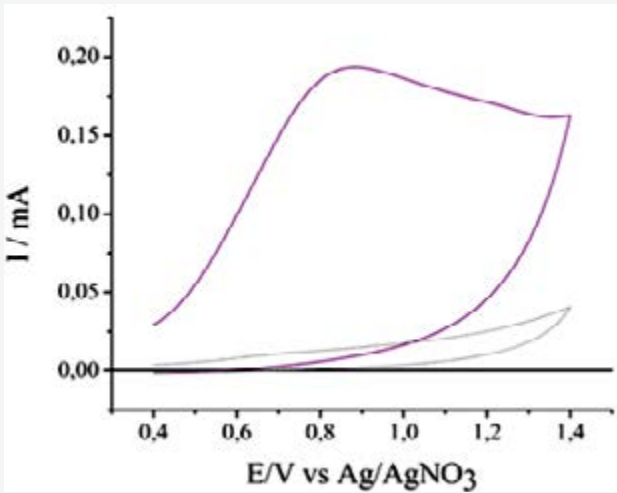


Figura 4. Respuesta voltamétrica en película delgada del electrodo de platino en una solución de Azitromicina 0,1 M. Velocidad de barrido: 5 mV/s.

Estudios por Espectroscopía IRTF por transmisión de la Azitromicina

En las tablas 1 y 2, se muestran las señales y asignaciones más resaltantes observadas en los espectros de trasmisión obtenidos para las soluciones del electrolito soporte en CH₃CN y de la Azitromicina 0,1 M disuelta en éste, las cuales fueron tomadas para

corroborar las asignaciones en los estudios *in situ*.

Tabla 1.- Asignación de las principales bandas del espectro infrarrojo de LiClO₄/CH₃CN 0,1 M.

Longitud de onda cm ⁻¹	Tipo de vibración
3002	Tensión asimétrica de C-H
2944	Tensión simétrica de C-H
2294-2250	Tensión C≡N
1444	Deformación asimétrica de C-H
1376	Deformación simétrica de C-H

Tabla 2.- Asignación de las principales bandas del espectro infrarrojo de la Azitromicina 0,1 M

Longitud de onda cm ⁻¹	Tipo de vibración
3512	Tensión O-H
2974 - 2796	Tensión asimétrica y simétrica de C-H
1718	Tensión C=O
1460	Flexión asimétrica C-H
1384	Flexión simétrica C-H
1180	Tensión asimétrica C-O-C
1056	Tensión simétrica C-O-C

Estudios por Espectroscopía IRTF in situ de la oxidación de la Azitromicina

Con la finalidad de caracterizar y/o confirmar los posibles productos de reacción de la Azitromicina en medio orgánico, se realizó el seguimiento de la reacción por infrarrojo *in situ*. En la figura 5 se muestran los espectros de reflectancia obtenidos en una solución de Azitromicina 0,1 M. Las bandas más resaltantes se reportan en las tablas 3.

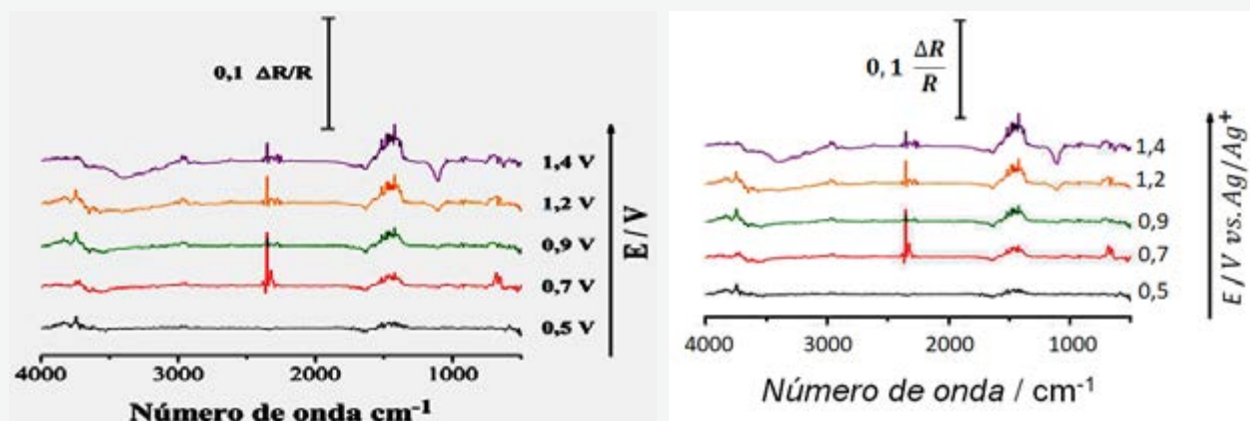


Figura 5.- Espectro IRTF in situ para la oxidación de Azitromicina 0,1 M en $\text{LiClO}_4/\text{CH}_3\text{CN}$ 0,1 M..

En los espectros infrarrojos normalizados (SNIFTIR) se aprecia en la región de 3517 cm^{-1} , una banda negativa producto de la vibración de tensión O-H. Entre 2968 y 2873 cm^{-1} se aprecia un conjunto de bandas atribuidas a las vibraciones de tensión C-H. Estas señales se van incrementando paulatinamente de forma positiva indicando la desaparición de estos enlaces de la estructura. La zona entre 2360 y 2234 cm^{-1} exhibe una serie de bandas negativas y positivas que aparecen desde $0,5\text{ V}$. Estas bandas pueden asignarse a la vibración de tensión del grupo nitrilo ($\text{C}=\text{N}$) y a combinaciones y deformaciones del grupo $-\text{C}=\text{N}^+-\text{C}-$ de las sales de iminas. El carácter positivo de las señales está asociado nuevamente al efecto de compensación de cargas en la película delgada [24]. No obstante, la banda que se observa a 2252 cm^{-1} de signo negativo y que distingue

claramente las sales de iminas [25], puede indicar la formación del ión iminio en el proceso de oxidación.

A partir de $0,7\text{ V}$ comienza a apreciarse la formación de una banda bipolar a aproximadamente 1700 cm^{-1} . El lóbulo negativo de esta señal se ubica en 1745 cm^{-1} y es comparable con la señal correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo de un ácido mientras que el lóbulo positivo se localiza a 1723 cm^{-1} y puede atribuirse a la vibración de tensión $\text{C}=\text{O}$ del grupo éster. La variación en la frecuencia de absorción del grupo carbonilo indica el cambio en el ambiente químico que podría experimentar este enlace en el proceso electroquímico. En último lugar, se observan un grupo de bandas entre 1108 y 1000 cm^{-1} , características del electrolito soporte.

Tabla 3.- Asignación de las principales bandas encontradas en el espectro SNIFTIR durante la oxidación de la Azitromicina 0,1 M / CH_3CN

Signo	Longitud de onda cm^{-1}	Tipo de vibración
-	3032	Tensión O-H
+	2967 - 2796	Tensión C-H
-	2368 - 2255	Deformaciones de $-\text{C}=\text{N}^+-\text{C}-$
-	1745	Tensión $\text{C}=\text{O}$ de $-\text{COOH}$
+	1725	Tensión $\text{C}=\text{O}$ de $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$

Mecanismo de oxidación de la Azitromicina

De acuerdo con la literatura, la Azitromicina se oxida en ambos grupos aminos y el primer paso de este proceso, es la pérdida de un electrón del par libre de electrones del átomo de nitrógeno dimetil sustituido^[16]. Bajo estas consideraciones, Ortiz y colaboradores al trabajar con Azitromicina en hexafluorofosfato de tetrabutilamonio/ Acetonitrilo, plantearon el esquema de reacción mostrado en la figura 6. Este

mecanismo indica que la Azitromicina al ser sometido a una diferencia de potencial se oxida en el nitrógeno del azúcar, para transformarse en una especie con número impar de electrones; esta estructura pierde un protón y genera un radical que nuevamente es oxidado y origina la sal de imina. Por último, la sal de imina formada experimenta un proceso similar sobre el nitrógeno de la macrolactona y produce una segunda sal de imina.

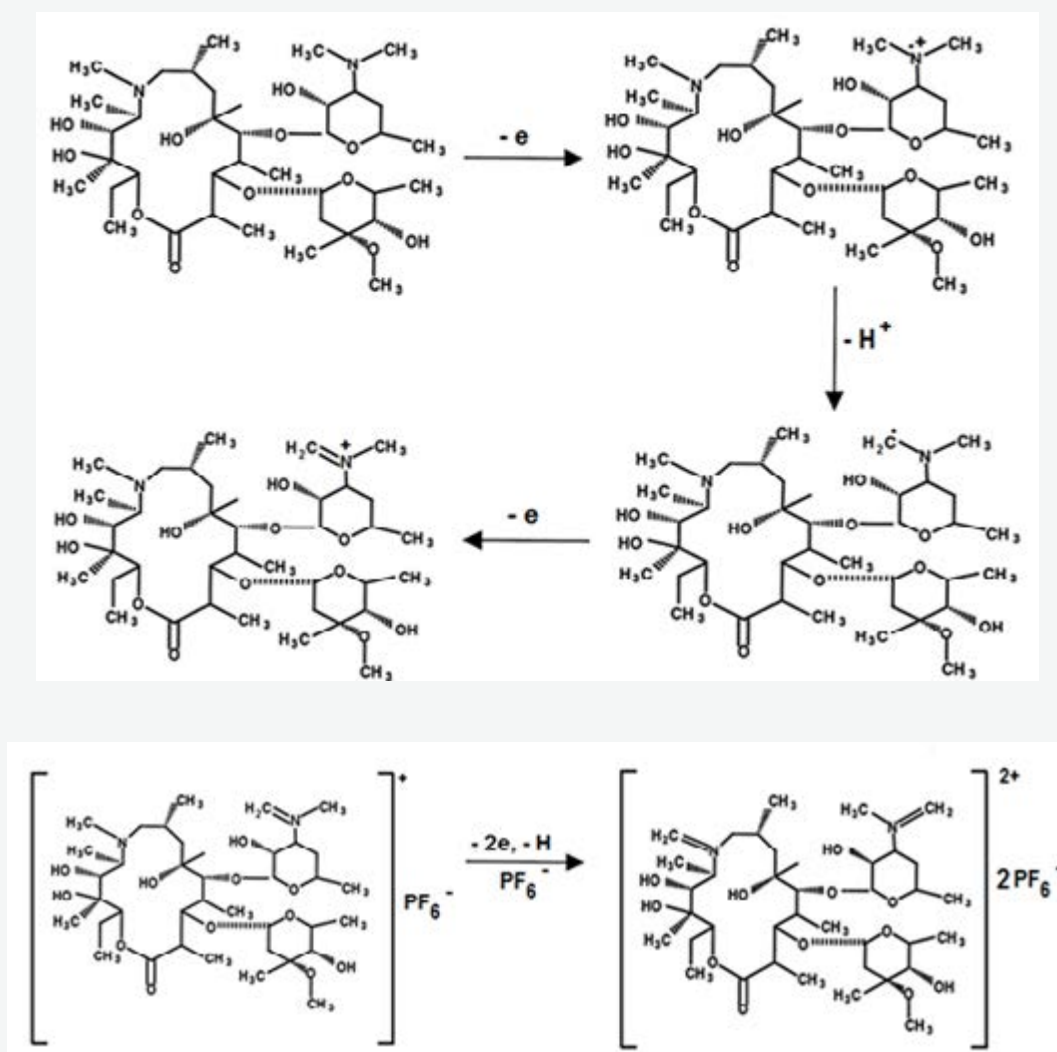


Figura 6.- Esquema de reacción para la oxidación de la Azitromicina.

Esta secuencia de reacciones podría explicar algunas de las bandas observadas en los espectros SNIFTIR de la oxidación de la

Azitromicina tales como la transformación de los grupos metilos que sustituyen a los átomos de nitrógeno en la estructura y la

formación del ión iminio. No obstante, debe considerarse que este proceso ocurriría de manera simultánea ya que el voltagrama cíclico sólo exhibe un pico de oxidación.

Por otra parte, en este mecanismo el grupo carbonilo de la molécula permanece invariable por lo que debe ocurrir una reacción adicional que produzca las modificaciones vistas para este grupo en los espectros

infrarrojos *in situ*. La bibliografía [16] reporta que parte de la Azitromicina que queda sin reaccionar electroquímicamente y también el producto de la oxidación del antibiótico puede experimentar una hidrólisis en medio ácido como consecuencia de la presencia de agua residual en el sistema y de los protones generados en el medio de reacción. Los productos de estas reacciones se muestran en la figura 7 y 8.

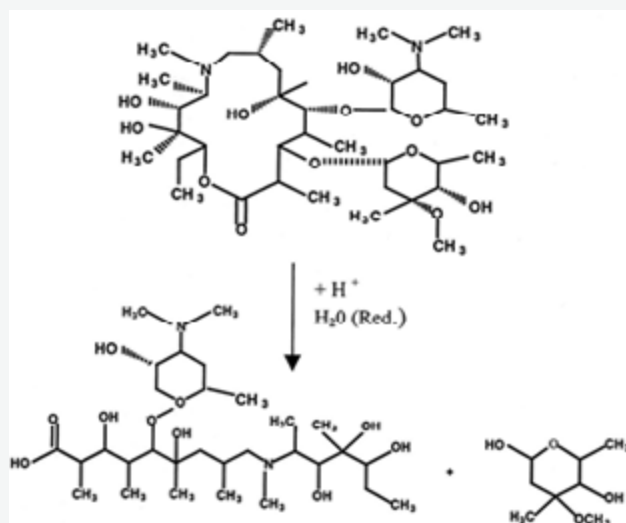


Figura 7.- Reacción colateral sobre la Azitromicina sin reaccionar.

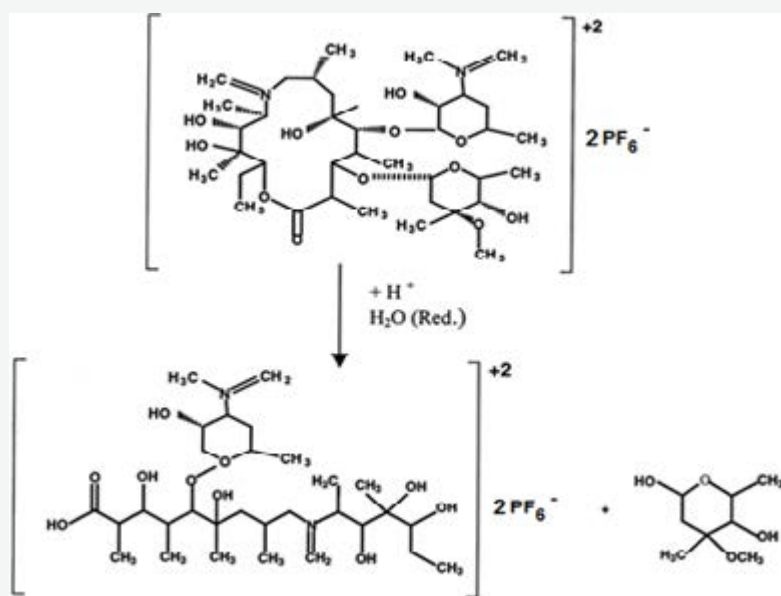


Figura 8.- Reacción colateral sobre el producto de oxidación de la Azitromicina.

Con el objeto de discernir si el sistema en estudio está siendo afectado por estas reacciones colaterales, se agregó un 4, 8, 12 y 18 % de agua al sistema. El agua introducida al sistema podría favorecer la posible reacción de hidrólisis. Esto nos permite evaluar la respuesta electroquímica y espectral de la Azitromicina.

Efecto de la adición de agua sobre la respuesta electroquímica de la Azitromicina

La señal atribuida a la oxidación de la Azitromicina a medida que se incrementa la cantidad de agua en el sistema es mostrada

en la figura 9. El estudio evidencia una disminución considerable en la definición del pico y en la corriente atribuida a la oxidación de la Azitromicina pico observado entre 0,75 y 1,5 V aproximadamente; esto es un indicio de que la Azitromicina en presencia de agua, sufre un proceso irreversible transformándose en sustancias electroquímicamente inactivas. Este comportamiento podría indicar que al incrementar el contenido de agua en el sistema, menor es la cantidad de Azitromicina que se oxida y en consecuencia, la corriente disminuye o que existe un proceso competitivo.

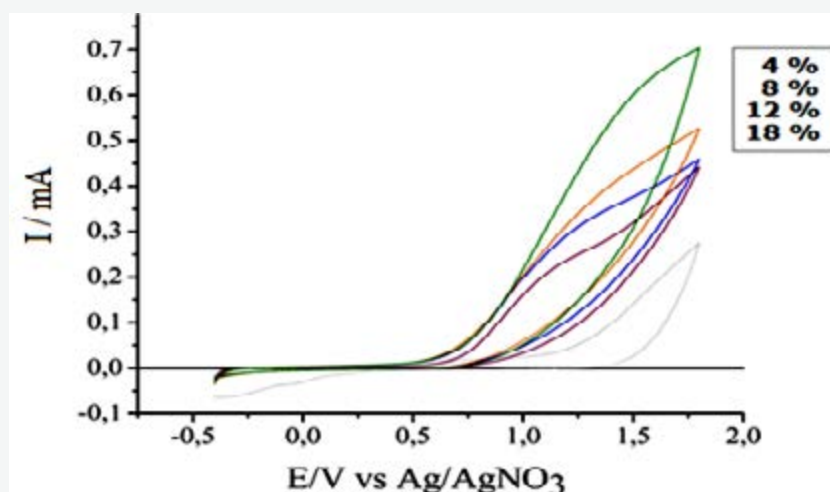


Figura 9.- Voltagrama cíclico de la oxidación de Azitromicina 0,1 M en $\text{LiClO}_4/\text{CH}_3\text{CN}$ con agregados de: 4 %, 8 %, 12 % y 18 % de agua a 100 mV/s.

Estudios por Espectroscopía IRTF *in situ* de la oxidación de la Azitromicina. Efecto de la adición de agua.

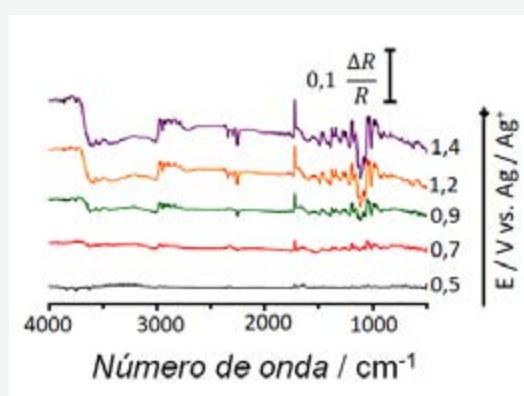
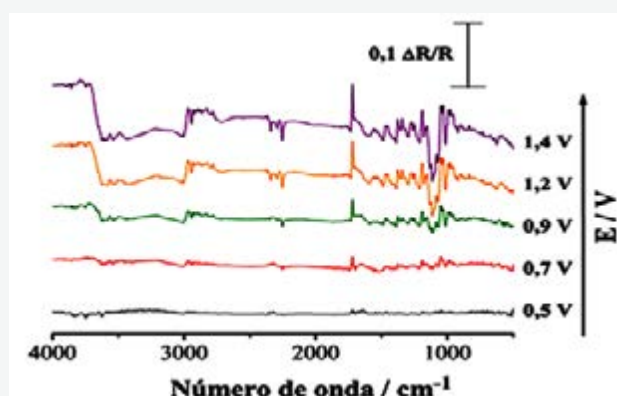
En este estudio se muestran los resultados obtenidos al agregar un 12 y un 18 % de agua al sistema. La presencia de agua en el medio electrolítico origina modificaciones en la respuesta espectral (figura 10). Las señales más importantes se localizan entre 2374 y 2252 cm^{-1} correspondientes a la vibración de tensión del grupo nitrilo ($\text{C}\equiv\text{N}$) y una banda negativa entre 1150 y 1070 cm^{-1} correspondientes a la absorción del ión ClO_4^- . Los espectros IRTF *in situ* obtenidos para la solución de Azitromicina 0,1 M luego de agregar 12 y 18% de agua (figuras 10 superior

y 10 inferior) muestran como era de esperar por estar por la presencia de agua en el sistema, un grupo de bandas a longitudes mayores de 3000 cm^{-1} . Adicionalmente, puede observarse entre 2973 y 2876 cm^{-1} el desarrollo de un grupo de bandas que pueden atribuirse a vibraciones de tensión de enlaces C-H. El incremento de estas bandas en sentido positivo a medida que se aumenta la diferencia de potencial, nuevamente indica la transformación de los grupos metilos que sustituyen este tipo de enlaces en la estructura.

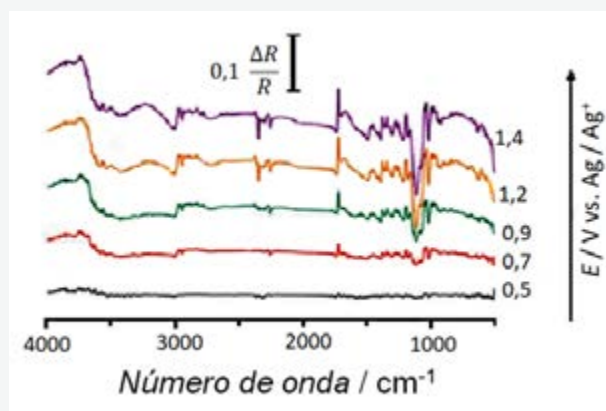
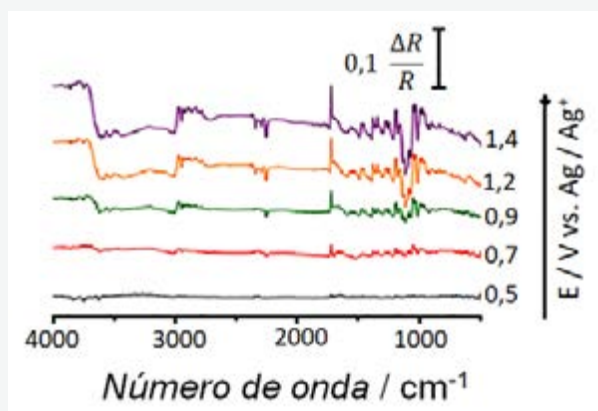
A longitudes de onda entre 2377 y 2255 cm^{-1} pueden distinguirse una combinación de bandas características de los grupos

grupo $-C=N^+-C-$ de las sales de iminas y la vibración de tensión del grupo $C\equiv N$. El cambio en los coeficientes de adsorción revela tanto la participación del solvente en la compensación de cargas en la interfase electrodo/solución como la posible formación del ión iminio durante la oxidación del antibiótico. A 1700 cm^{-1} aproximadamente, se observa nuevamente la formación de una banda bipolar. El lóbulo negativo se ubica en 1733 cm^{-1} y el lóbulo positivo en 1721 cm^{-1} . Esta banda es atribuida

a la vibración de tensión del grupo carbonilo de un ácido y la vibración de tensión $C=O$ del grupo éster, respectivamente. Por último, en la región comprendida entre 1109 y 1048 cm^{-1} se aprecian las bandas originadas por la absorción del electrolito soporte. El incremento en el carácter negativo de esta banda al aplicar un potencial mayor de $0,7\text{ V}$ indica el aumento de las especies negativas en las cercanías del electrodo debido a efectos electrostáticos [24].



A



B

Figura 10.- Espectros FTIR in situ para la oxidación de: A) Azitromicina $0,1\text{ M} + 12\%$ y B) Azitromicina $0,1\text{ M} + 18\%$ de agua, ambos en $\text{LiClO}_4/\text{CH}_3\text{CN } 0,1\text{ M}$.

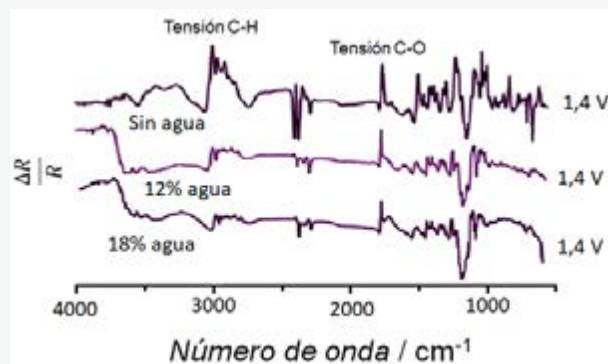
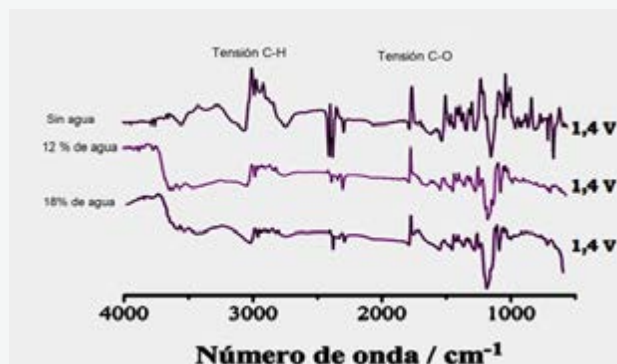


Figura 11.- Comparación de los espectros IRTF *in situ* para la oxidación de Azitromicina 0,1 M, influencia del agua agregada al solvente.

En la figura 11 se hace un estudio comparativo de los espectros IRTF *in situ* tomados a 1,4V durante la oxidación de Azitromicina 0,1 M en el medio en estudio y la influencia del agua agregada al medio electrolítico. La banda que mejor caracteriza en términos cuantitativos el proceso de oxidación de la Azitromicina, es la correspondiente a la transformación de los grupos metilos que sustituyen a los átomos de nitrógeno, ubicada entre 2973 y 2876 cm⁻¹. Sin agua añadida, esta banda es

50 % mayor que la producida por el grupo C=O a 1,4 V. Al agregar agua al sistema, el análisis espectral permitió ver un cambio en la intensidad de la banda del grupo carbonilo. Al aumentar la cantidad de agua en 12 y 18 %, la señal del C=O se incrementa en 30 y hasta en 60 % aproximadamente, respecto a la banda de tensión C-H. Estos resultados apoyan la idea de que una de las reacciones colaterales podría ser la hidrólisis del grupo éster en medio ácido.

Conclusiones

La respuesta electroquímica del electrodo de platino sumergido en una solución de Azitromicina 0,1 M empleando LiClO₄/CH₃CN 0,1 M como electrolito soporte, indican que es posible observar la oxidación irreversible del antibiótico en un intervalo de velocidades de barrido entre 5 y 1000 mV/s. La respuesta electroquímica del sistema en ausencia de agua permitió corroborar la transformación de los grupos metilos que sustituyen a los átomos de nitrógeno y la formación de una sal de imina como producto de la oxidación de la Azitromicina.

Los estudios de voltametría cíclica realizados al sistema en presencia de los porcentajes de agua añadidos, confirman que al adicionar agua al sistema en estudio, disminuye la cantidad de Azitromicina oxidada favoreciendo la hidrólisis del grupo éster de la estructura. La respuesta espectral al añadir agua al sistema, confirma la hidrólisis del grupo éster de la Azitromicina, estas reacciones colaterales que ocurren podrían estar asociadas a la Azitromicina que queda sin reaccionar, al producto de la oxidación o a ambas simultáneamente.

Referencias

- 1- Cobos-Trigueros, N. (2009). "Macrólidos y cetólidos". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 27, (7): 412-418.

- 2- Salazar, E.; Perrone, M. (2001). "Rol de la Azitromicina en el tratamiento de abscesos periodontales". *Acta Odontológica Venezolana*. 39 (3): 1-6.
- 3- Ali Mallah, M. (2011). "Assessment of Azithromycin in Pharmaceutical Formulation by Fourier-transform Infrared (FT-IR) Transmission Spectroscopy". *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 12 (1-2): 1-7.
- 4.- Parnham M. J., E. Haber V., Giamarellos-Bourboulis E. J., Perletti G., Verleden G. M. and Vos R. (2014). "Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications" *Pharmacol Ther.* 143(2): 225-45.
- 5- Gautret, P., Lagier, J. C., Parola, P., Hoang, V. T., Meddeb, L., Mailhe, M., Doudier, B., Courjon, J., Giordanengo, V., Vieira, V. E., Tissot Dupont, H., Honoré, S., Colson, P., Chabrière, E., La Scola, B., Rolain, J. M., Brouqui, P., & Raoult, D. (2020). "Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial". *International Journal of Antimicrobial Agents*. 56(1): 105949.
- 6- Zhang, S. and Jiang, J.-Q. (2020), Comparative removal of imidacloprid, bisphenol-S, and azithromycin with ferrate and FeCl₃ and assessment of the resulting toxicity. *J Chem Technol Biotechnol*. doi:10.1002/jctb.6515. Aceptado
- 7- Chen, L.; Qin, F. (2007) "Quantitative determination of azithromycin in human plasma by ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study". *Journal of Chromatography B*. 855(2) : 255–261.
- 8- Lucchi, M.; Damle, B. (2008) "Pharmacokinetics of azithromycin in serum, bronchial washings, alveolar macrophages and lung tissue following a single oral dose of extended or immediate release formulations of azithromycin". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 61(4) 884–891.
- 9- Tshilumba, P., Muindu, M., Kasongo, M., Mujinga, G., Zabakani, M., Kasongo, J., Tshamba, M., Nkwanga, J., Djang'eing'a, R., Duez, P. and Ndoumba, J. (2019) . Substandard/ Falsification Antibacterial Agents: A Systematic Review of Liquid Chromatographic and Spectrophotometric Methods for Their Detection. *American Journal of Analytical Chemistry*, 10, 348-365.
- 10- Li-Xin W., Ya-Ping L., Chang-Qin H. Y. C. (2016) "Factors Influencing the HPLC Determination for Related Substances of Azithromycin, *Journal of Chromatographic Science* 54(2) : 187–194.
- 11- Sobhy M. E., Mohamed E. E., Marwa H. H. (2019) "Spectrophotometric Analysis of Azithromycin and Clarithromycin in Tablets and Human Plasma Using p-Chloranilic Acid" *Analytical Chemistry Letters*, 9(3): 362-372.
- 12- Mandić, Z.; Weitner, Z. (2003) "Electrochemical oxidation of azithromycin and its derivatives" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33(4): 647-654.
- 13- Komorsky-Lovrić, Š.; Nigović, B. (2004) "Identification of 5-aminosalicylic acid, ciprofloxacin and azithromycin by abrasive stripping voltammetry". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36: 81–89.
- 14- Farghaly, O.; Mohamed, N. (2004) "Voltammetric determination of azithromycin at the carbon paste electrode". *Talanta* 62(3): 531–538.

- 15- Wu, Y.; Ji, X. (2004) "Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin". *Bioelectrochemistry* 64(1) 91- 97.
- 16- Araujo, J.; Ortiz, R. (2006) "Determination of Azithromycin in Pharmaceutical Formulations by Differential Pulse Voltammetry. Comparison with Fourier Transformed Infrared Spectroscopic Analysis". *Portugaliae Electrochimica Acta* 24(1) :71-81.
- 17- Peng, J. (2011) "Electrochemical behavior of azithromycin at graphene and ionic liquid composite film modified electrode" *Talanta* 86(30) : 227-232
- 18.- Ioan-Adrian Stoian, Bogdan-Cezar Iacob, Cosmina-Larisa Dudaş, Lucian Barbu-Tudoran, Diana Bogdan, Iuliu Ovidiu Marian, Ede Bodoki, Radu Oprean. (2020) "Biomimetic electrochemical sensor for the highly selective detection of azithromycin in biological samples" *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 155: 112098
- 19.- Saied Jafari, Mohammad Dehghani, Navid Nasirizadeh, Mostafa Azimzadeh (2018) "An azithromycin electrochemical sensor based on an aniline MIP film electropolymerized on a gold nano urchins/graphene oxide modified glassy carbon electrode" *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 829: 27-34,
- 20.- Patrícia Rebelo,ab João G. Pacheco, M. Natália D. S. Cordeiro, André Melob and Cristina Delerue-Matosa (2020) "Azithromycin electrochemical detection using a molecularly imprinted polymer prepared on a disposable screen-printed electrode" *Anal. Methods*, 12: 1486-1494
- 21.- R. Ortiz, K. MárquezO. P. Márquez, J. Márquez. (2003) "In situ FTIR monitoring of Ag and Au Electrodeposition on glassy carbon and silicon". *Electrochimica Acta* 48(6), 711-720
- 22.- L.F. D'Elia and R. Ortiz / (2005) *Electrochemical Oxidation of Toluene on Glassy Carbon Electrodes in Organic Medium* " *Portugaliae Electrochimica Acta* 23 481-490.
- 23- D'Elia, L. F. Ortiz R. L., Rinón L., (2004) "Evaluation of titanium dioxide and cerium oxide as anodes for the electrooxidation of toluene: A theoretical approach of the electrode process". *Electrochimica Acta* 49(24): 4197-4203
- 24 -Ortíz, R.; Márquez, O., Gutierrez C. (1996) "Necessity of oxygenated surface species for the electrooxidation of methanol on iridium". *Journal Physical Chemistry* 100 (20) 8389-8396.
- 25- Conley, R. "Espectroscopía infrarroja". Editorial ALHAMBRA. 1º Edición. España. (1979), 94-217.