

Estudio de cesión de cefalosporinas incluidas en cementos óseos acrílicos.

HIYOMAT OSSETE GASSAKIT, PALOMA FRUTOS CABANILLAS Y SUSANA TORRADO DURÁN

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.*

RESUMEN

El progresivo aumento de la esperanza de vida ha originado un notable incremento de las patologías degenerativas óseas que requieren implatación de prótesis. Estas intervenciones quirúrgicas conllevan en ocasiones serias complicaciones entre las que cabe destacar las infecciones bacterianas. La gentamicina es el agente antimicrobiano de elección incluido en los cementos acrílicos para la prevención de dichas osteomielitis. Sin embargo, debido a la creciente aparición de cepas bacterianas resistentes a la gentamicina, en este trabajo se propone la utilización de terapia local antibacteriana con otros antibióticos del grupo de las cefalosporinas como son la ceftazidima y la cefotaxima.

En el presente estudio, se validan los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de las cefalosporinas, que se basan en la formación de complejos coloreados tras la reacción de la ceftazidima o cefotaxima con el cloruro de paladio como reactivo y la posterior determinación espectrofotométrica UV-Vis de los mismos a las longitudes de onda de 354 y 280 nm respectivamente. Posteriormente, se ha realizado un estudio de cesión "in vitro" de estos antibióticos tras su inclusión en cementos óseos acrílicos de polimetilmetacrilato (PMMA).

Palabras clave: ceftazidima, cefotaxima, cementos óseos acrílicos, PMMA, estudios de cesión.

SUMMARY

Release assay of cephalosporins included in acrylic bone cements.

The progressive increase of the life expectancy has developed a notable increase of bone degenerative pathologies that requires the use of polymeric implants. Sometimes, the employ of this orthopaedic surgery involve serious complications such as bacterial infections. Gentamicin is the antibacterial agent usually included within these polymeric implants to prevent osteomyelitis. Nevertheless, due to the increase existence of gentamicin resistant bacterial roots, in the present work the use of cephalosporin antibiotics such as ceftazidime and cefotaxime is proposed.

This study includes the validation of the assay methods of both cephalosporins which consists in the reaction of ceftazidime or cefotaxime with an especial reactive (palladium chloride) giving coloured complexes that were analysed by UV-Vis spectrophometry at 354 and 280 nm, respectively. Finally an "in vitro" dissolution study was performed to evaluate the release of both antibiotics from poly(methylmethacrylate) (PMMA) bone cements.

Key words: ceftazidime, cefotaxime, acrylic bone cement , PMMA, release study

INTRODUCCIÓN.

El progresivo envejecimiento de la población de los países industrializados hace cada vez más frecuente la sustitución quirúrgica de articulaciones dañadas por prótesis de tipo metálico o polimérico. Los cementos óseos acrílicos de polimetilmetacrilato (PMMA) se emplean para colocar y afianzar estas prótesis. Una de las principales complicaciones que se pueden presentar en el periodo postoperatorio son las infecciones bacterianas.

Para la prevención y el tratamiento de estas infecciones en general, y en particular, para las infecciones óseas, se puede utilizar la terapia antibiótica sistémica. Sin embargo, la escasa vascularización y la rigidez estructural de este tejido, hacen muy difícil alcanzar las concentraciones

locales de antibióticos requeridas, que por otra parte, pueden incluso ser perjudiciales debido a los importantes efectos tóxicos dosis-dependientes de algunos de los antibióticos utilizados.

Por este motivo, en los años setenta y ochenta (1, 2, 3), se introdujo el concepto de la terapia local antibacteriana, en forma de cementos óseos impregnados con antibióticos para la prevención de las infecciones óseas. En la actualidad se continúan utilizando de forma generalizada cementos óseos acrílicos de polimetilmetacrilatos que contienen antibióticos para la prevención de infecciones locales, tanto de huesos como de tejidos blandos.

La principal ventaja que presenta la terapia local frente a la terapia sistémica es que cede altas concentraciones del antibacteriano en la zona, evitándose la aparición de efectos secundarios como nefrotoxicidades, ototoxicidades y complicaciones alérgicas, ya que la terapia sistémica requiere altas dosis de antibiótico para conseguir una buena efectividad en una zona, que está pobremente vascularizada, como es el hueso infectado. El antibiótico administrado "in situ" parece que sistémicamente no se absorbe y es más efectivo, alcanzándose concentraciones locales de fármaco de 5 a 10 veces superiores a las conseguidas con la administración parenteral (4, 5, 6).

En los cementos óseos, el antibiótico más utilizado ha sido la gentamicina por ser un agente que resiste las altas temperaturas alcanzadas en la polimerización de los cementos.

En este trabajo se ha sustituido la gentamicina por dos cefalosporinas, la ceftazidima y la cefotaxima, debido a que su espectro de acción es más amplio frente a microorganismos gram (-). La ceftazidima ocupa un lugar intermedio entre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación ya que aunque formalmente se la suele incluir entre las de tercera, su potente actividad antipseudomonas sugiere una clara diferencia sobre la mayoría de las incluidas en ese grupo. La cefotaxima es el antibiótico más ampliamente utilizado dentro del grupo de las cefalosporinas de tercera generación y entre sus indicaciones se encuentran las infecciones óseas y articulares producidas por *Pseudomonas aeruginosa* (7).

El objetivo de este trabajo, es estudiar la liberación de las cefalosporinas a partir de los cementos óseos acrílicos comercializados mas ampliamente utilizados como son los polimetilmetacrilatos (PMMA). Para lo cual ha sido necesario en primer lugar poner a punto los métodos analíticos necesarios para la cuantificación de las cefalosporinas cedidas en el medio de disolución empleado. Existen numerosas técnicas analíticas descritas en la bibliografía para la cuantificación de las cefalosporinas (8, 9, 10, 11, 12). Entre estas, se puede enumerar la electroforesis, la espectrofluorometría, la cromatografía de alta presión y la espectrofotometría. En este trabajo, el método elegido por su sencillez, rapidez y economía es una reacción colorimétrica originada entre la ceftazidima o la cefotaxima con el reactivo de cloruro de paladio y su posterior determinación espectrofotométrica.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Cementos:CMW1 Radiopaque[®] (De Puy International Ltd)
- Ceftazidima (Lilly.S.A).
- Cefotaxima en sal sódica (Sigma–Aldrich)
- Cloruro de paladio (II) (Sigma–Aldrich).
- Tampón fosfato PBS pH 7.4.
- El resto de los compuestos utilizados fue de calidad reactivo o superior.

1. Método de análisis de la ceftazidima y de la cefotaxima

En este trabajo experimental se ha utilizado la espectrofotometría UV-Vis para la cuantificación de la ceftazidima o cefotaxima que reaccionan con el cloruro de paladio (PdCl_2) formando en cada caso un complejo coloreado. La reacción se basa en un intercambio de cargas del grupo tiazol de las cefalosporinas que se comportan como compuestos donantes mientras que el cloruro paladio será el compuesto aceptor de

cargas. El complejo resultante adquiere un color amarillo-marrón (13). Una de las grandes ventajas que presenta este complejo es su elevada solubilidad en medio acuoso, lo cual es muy adecuado para posteriormente cuantificar las cefalosporinas cedidas en el tampón acuoso PBS utilizado en los ensayos de cesión de los cementos óseos acrílicos.

Preparación de las soluciones reactivas:

- a) Solución madre de ceftazidima o cefotaxima 0,2mg/ml en agua purificada.
- b) Solución de cloruro de paladio $2 \cdot 10^{-3} M$, que se prepara pesando el compuesto y adicionando 1ml de ácido clorhídrico concentrado con ayuda de calor, a continuación se añaden 50ml de agua purificada con agitación y finalmente se enrasa a 100ml con el mismo solvente.
- c) Solución de lauril sulfato sódico al 0,2 % p/v.
- d) Solución tampón de acetato Walpole que consiste en preparar previamente dos soluciones acuosas, una solución de ácido acético 0,2 M y una solución de acetato de sodio 0,2 M, que finalmente se mezclan para alcanzar un pH de 4,8.

Procedimiento analítico:

A un volumen de entre 0,4 y 1,4ml de la solución madre de ceftazidima o cefotaxima se le adicionan 2ml de la solución de cloruro de paladio, 4ml de la solución tampón de acetato Walpole, 1ml de la solución de laurilsulfato sódico y finalmente se enrasa con agua purificada a 25 ml. Se deja reaccionar la mezcla en un baño termostático a 80°C durante 45min y finalmente se mide la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU-7 a los máximos de absorbancia correspondientes que fueron de 354nm para la ceftazidima y 280nm para la cefotaxima.

2. Preparación del cemento

En un recipiente adecuado se mezclan cuidadosamente el polvo del cemento comercial con la cefalosporina correspondiente para obtener un cemento con una concentración del 4% de principio activo. A continuación se realiza la polimerización con el monómero líquido y se preparan manualmente muestras de forma esférica y de un peso aproximado de 5g. Una vez finalizado el fraguado, el cemento se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas en una cabina de flujo de aire para eliminar los restos de monómero líquido que no reaccionan.

3. Ensayo de cesión “in vitro”

En la figura 1 se muestra el dispositivo utilizado para realizar el estudio de cesión que fue diseñado para determinar la cesión de la gentamicina contenida en los cementos óseos acrílicos Gentamicin CMW1[®] (14, 15).

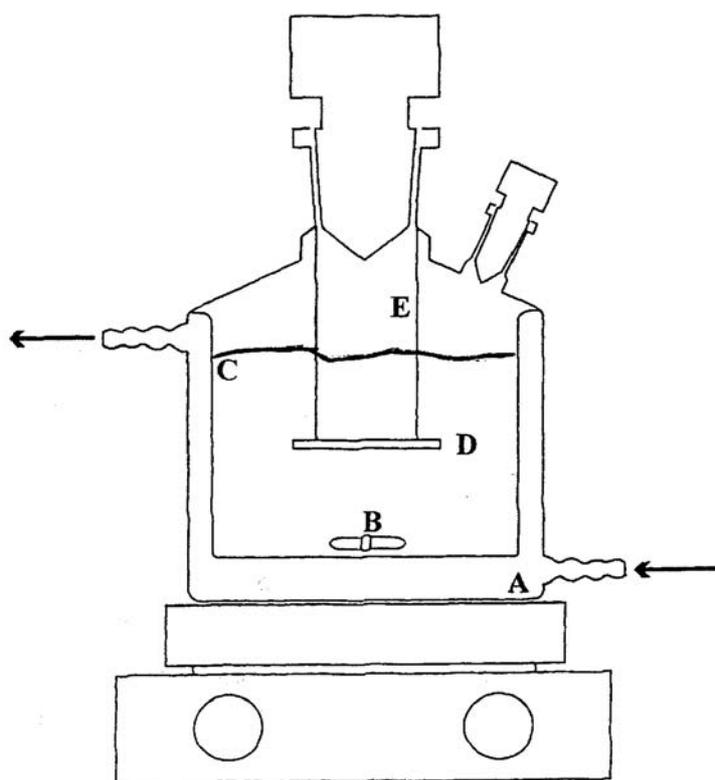


FIGURA 1.- Dispositivo utilizado en el ensayo de cesión

El reactor de vidrio utilizado es un sistema que consta de 2 bocas, una mayor que nos permite introducir la muestra al iniciar el ensayo, y otra menor para la toma de muestra. Cada una de esta bocas se puede cerrar con un tampón esmerilado que evita la pérdida de solvente por

evaporación en los largos períodos de tiempo durante los que se lleva a cabo el ensayo.

La capacidad del vaso interior es de 300 ml y se encuentra rodeado por una camisa de recirculación (A) conectado a un baño termostático con el objeto de mantener una temperatura constante de 37°C, similar a las condiciones fisiológicas. El reactor se sitúa encima de un agitador magnético (B) para mantener una agitación constante (150 rpm) durante el ensayo, que permite una distribución homogénea del principio activo cedido por todo el medio.

El ensayo se realiza con tres reactores a la vez, para cada cefalosporina y en cada uno se coloca una muestra de cementos aproximadamente 5g.

En cada uno de estos reactores, se añadió 150 ml de tampón fosfato pH 7,4 (C). La muestra (D) se introduce en el reactor de forma que quede completamente sumergida en el solvente sujeta mediante un cable de acero inoxidable (E).

Una vez iniciado el ensayo se toman alícuotas de 3 ml del solvente sin reposición, a intervalos adecuados de tiempo. Cada alícuota se hace pasar a través de un filtro de membrana de 0.45µm y se mantiene a -4°C hasta que se procede a su valoración espectrofotométrica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Validación de los métodos analíticos

Linealidad ceftazidima

La tabla 1 muestra los datos experimentales de los valores de absorbancia obtenidos con las diferentes concentraciones de ceftazidima ensayadas y sus correspondientes factores de respuesta.

Tabla 1. Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad del método de análisis de ceftazidima.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Factor de respuesta $\cdot 10^{-3}$
8,88.	0,1734	19,52
9,04	0,1829	20,23
8,88	0.1704	19,18
13,32	0,2473	18,56
13,54	0,2587	19,10
13,32	0,2564	19,24
17,76	0,3317	18,67
18,08	0,3416	18,89
17,76	0,3422	19,26
22,2	0,4169	18,77
22,6	0,4220	18,67
22,2	0,4062	18,29
26,64	0,4910	18,43
27,12	0,5027	18,53
26,64	0,4989	18,72
31,08	0,5823	18,73
31,64	0,5773	18,24
31,08	0,5818	18,71

En la tabla 2 se muestran los resultados del ajuste a un modelo lineal para describir la relación entre la absorbancia y la concentración de ceftazidima. De acuerdo a estos resultados, la absorbancia como función de la concentración sigue un modelo lineal según la siguiente ecuación:

$$A = 12,9987 \cdot 10^{-3} + 18,1042 \cdot 10^{-3} \cdot C$$

El coeficiente de correlación tiene un valor de 0,999363, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. La r^2 estadística indica que el modelo ajustado explica un 99,8727% de la variabilidad en la absorbancia. El error estándar de los estimados muestra que la desviación estándar de los residuales es de 0,0052319 para 16 grados de libertad.

Tabla 2. Resultados de la regresión lineal de los datos de absorbancia frente a concentración obtenidos en el ensayo de linealidad de ceftazidima.

Parámetros	Estimado	Error estándar	t-Estadística	Valor-p
Ordenada	$12,9987 \cdot 10^{-3}$	$3,47 \cdot 10^{-3}$	3,74166	0,018
Pendiente	$18,1042 \cdot 10^{-3}$	$1,61 \cdot 10^{-4}$	112,036	0,000

En la figura 2 se muestra una curva típica de calibración para la absorbancia frente a la concentración de ceftazidima en la que se incluyen los límites de confianza para un 95% y los puntos de los datos obtenidos.

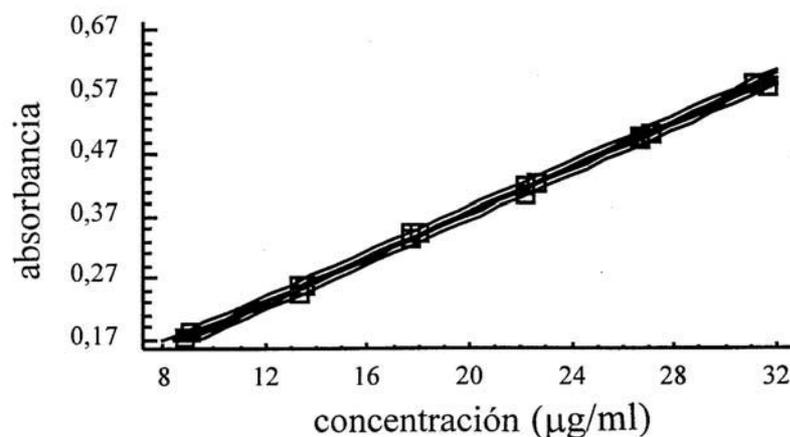


FIGURA 2.- Regresión lineal de los datos de absorción frente a concentración de ceftazidima obtenidos en el ensayo de linealidad con los límites de predicción y de confianza

Se ha realizado una evaluación complementaria de la bondad del ajuste de un modelo lineal de primer orden mediante un análisis de la varianza con falta de ajuste. Este test está diseñado para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados o si debiera ser empleado un modelo más complicado.

El test se lleva a cabo comparando la variabilidad de los residuales del modelo empleado con la variabilidad entre observaciones para valores replicados de la variable independiente (concentración). Puesto que el valor de p de la tabla de ANOVA es menor que 0,01 hay una relación estadísticamente significativa entre la absorción y la concentración con un nivel de confianza de 99%. Por otra parte, dado que el valor de p del

ANOVA con la falta de ajuste (tabla 3) es mayor que 0,10 el ajuste al modelo lineal parece ser adecuado para los valores observados.

Tabla 3. Linealidad de ceftazidima. Análisis de Varianza con falta de ajuste.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Valor F	Valor -p
Modelo	0,343588	1	0,1343588	12552,15	0,000
Residuales	$4,37 \cdot 10^{-4}$	16	$2,73 \cdot 10^{-5}$		
Falta de ajuste	$2,48 \cdot 10^{-4}$	10	$2,48 \cdot 10^{-5}$	0,79	0,6496
Puro Error	$1,89 \cdot 10^{-4}$	6	$3,16 \cdot 10^{-5}$		
Total (Corr.)	0,344026	17			

Repetibilidad ceftazidima

El ensayo de repetibilidad del método de análisis de la ceftazidima se ha realizado a tres niveles de concentración (13,56; 18,08 y 22,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En cada nivel se analizaron cuatro muestras independientes obteniéndose unos coeficientes de variación de 1,76; 0,61 y 0,93 respectivamente. En la tabla 4 se comparan los 4 valores de los datos experimentales para cada uno de los tres niveles de concentración y se observa que los grupos fueron homogéneos y que la diferencia entre los grupos contrastados se encuentra en todos los casos dentro de los límites de lo que se deduce que el

método presenta una adecuada repetibilidad, para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 4. Comparación datos repetibilidad de ceftazidima.

Niveles	Valores	Media $\times 10^{-3}$	Grupos homogeneos	Contraste	Diferencia $\times 10^{-3}$	+/- límites $\times 10^{-3}$
1	4	24,540	X	1-2	0,2775	0,545368
2	4	24,265	X	1-3	-0,1750	0,545368
3	4	24,715	X	2-3	-0,4525	0,545368

Reproducibilidad de la ceftazidima

La reproducibilidad del método de análisis de la ceftazidima se ha evaluado por medio de un estudio que incluyó 8 días de análisis de muestras a tres niveles de concentración 13,56; 18,08 y 22,6 $\mu\text{g/ml}$. En la tabla 5 se comparan los 8 valores de los datos experimentales para cada uno de los tres niveles de concentración y se deduce que el método es reproducible.

Tabla 5. Comparación datos reproducibilidad de ceftazidima.

Niveles	Valores	Media $\times 10^{-3}$	Grupos homogeneos	Contraste	Diferencia $\times 10^{-4}$	+/- límites $\times 10^{-3}$
1	8	24,75	X	1-2	3,35	0,5571
2	8	24,42	X	1-3	-0,82	0,5571
3	8	24,83	X	2-3	-4,17	0,5571

Linealidad de la cefotaxima

La tabla 6 muestra los datos experimentales de los valores de absorbancia obtenidos con las diferentes concentraciones de cefotaxima ensayadas y sus correspondientes factores de respuesta.

Tabla 6. Resultados obtenidos en el ensayo de linealidad del método de análisis de cefotaxima.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Factor de respuesta $\times 10^{-2}$
2,56	0,1235	4,82
2,61	0,1273	4,87
2,62	0,1304	4,97
5,12	0,2427	4,74

5,22	0,2571	4,92
5,24	0,2413	4,60
7,68	0,3726	4,85
7,83	0,3752	4,79
7,86	0,3814	4,85
10,24	0,4788	4,67
10,44	0,4871	4,66
10,48	0,4893	4,66
12,80	0,6171	4,82
13,05	0,6297	4,82
13,10	0,6259	4,77
15,36	0,7588	4,94
15,66	0,7614	4,86
15,72	0,7606	4,83
17,92	0,8716	4,86
18,22	0,8891	4,87
18,34	0,8812	4,80
20,48	0,9779	4,77
20,88	0,9861	4,72
20,96	0,9813	4,68

En la tabla 7 se muestran los resultados del ajuste a un modelo lineal para describir la relación entre la absorbancia y la concentración de cefotaxima. De acuerdo a estos resultados, la absorbancia como función de la concentración sigue un modelo lineal según la siguiente ecuación:

$$A = 9,71211 \cdot 10^{-4} + 4,787 \cdot 10^{-2} \cdot C$$

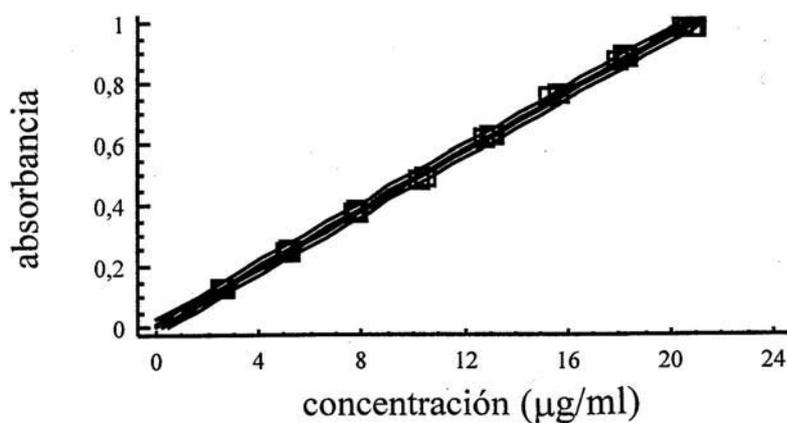
El coeficiente de correlación tiene un valor de 0,999331, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. La r^2 estadística indica que el modelo ajustado explica un 99,8662% de la variabilidad en la absorbancia. El error estándar de los estimados muestra que la desviación estándar de los residuales es 0,0108903 para 22 grados de libertad.

Tabla 7. Resultados de la regresión lineal de los datos de absorbancia frente a concentración de cefotaxima obtenidos en el ensayo de linealidad

Parámetros	Estimado	Error estándar	t-Estadística	Valor-p
Ordenada	$9,7121 \cdot 10^{-4}$	$4,89 \cdot 10^{-3}$	0,198245	0,8447
Pendiente	$4,7876 \cdot 10^{-2}$	$3,73 \cdot 10^{-4}$	128,122	0,000

En la figura 3 se muestra una curva típica de calibración para la absorbancia frente a la concentración de cefotaxima en la que se incluyen los límites de confianza para un 95% y los puntos de los datos obtenidos.

FIGURA 3.- Regresión lineal de los datos de absorbancia frente a concentración de cefotaxime obtenidos en el ensayo de linealidad con los límites de predicción y de confianza.



El valor de p de la tabla de ANOVA es menor que 0,01 por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración con un nivel de confianza de 99%. El valor de p del test de ANOVA con la falta de ajuste (tabla 8) es mayor que 0,10 de lo que se deduce que el ajuste al modelo lineal es adecuado para los valores observados.

Tabla 8. Linealidad de cefotaxima. Análisis de Varianza con falta de ajuste.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F ratio	Valor-p
Modelo	1,91153	1	1,91153	7646,17	0,000
Residuales	$5,49 \cdot 10^{-3}$	22	$2,49 \cdot 10^{-4}$		
Falta de ajuste	$2,48 \cdot 10^{-4}$	16	$2,48 \cdot 10^{-5}$	27,55	0,3254
Puro Error	$1,89 \cdot 10^{-4}$	6	$2,127 \cdot 10^{-5}$		
Total (Corr.)	0,91703	23			

Repetibilidad de la cefotaxima

El ensayo de repetibilidad de la cefotaxima se ha realizado a tres niveles de concentración (7,68; 10,24 y 12,85 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y repetido cuatro veces obteniéndose unos coeficientes de variación de 1,3; 1,9 y 0,6 % respectivamente. la comparación estadística de los datos obtenidos se recoge en la tabla 9 para un nivel de confianza del 95%. El método de análisis de la cefotaxima demuestra ser repetible.

Tabla 9. Comparación datos repetibilidad de cefotaxima.

Niveles	Valores	Media $\times 10^{-1}$	Grupos homogeneos	Contraste	Diferencia $\times 10^{-3}$	+/- límites $\times 10^{-3}$
1	4	4,4475	X	1-2	0,185	0,197948
2	4	4,2625	X	1-3	0,130	0,197948
3	4	4,3175	X	2-3	-0,055	0,197948

Reproducibilidad de la cefotaxima

La reproducibilidad del método de análisis de la cefotaxima se ha evaluado por medio de un estudio que incluyó 8 días de análisis de muestras a tres niveles de concentración 7,86; 10,48 y 13,10 $\mu\text{g/ml}$. En la tabla 10 se comparan los 8 valores de los datos experimentales para cada uno de los tres niveles de concentración y se observa que el método es reproducible.

Tabla 10. Comparación datos reproducibilidad de cefotaxima.

Niveles	Valores	Media $\times 10^{-3}$	Grupos homogeneos	Contraste	Diferencia $\times 10^{-3}$	+/- límites $\times 10^{-3}$
1	8	0,0478	X	1-2	0,16	1,570
2	8	0,0479	X	1-3	1,37	1,570
3	8	0,0464	X	2-3	1,53	1,570

Ensayo de disolución

En la figura 4 se muestran los perfiles de cesión de la ceftazidima a partir de las tres muestras de cemento óseo acrílico en las que se había incorporado dicha cefalosporina.

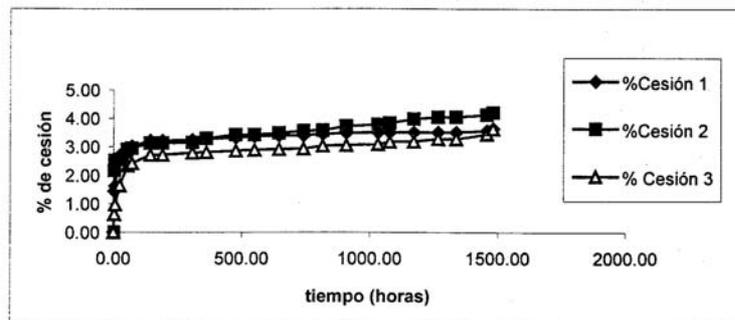
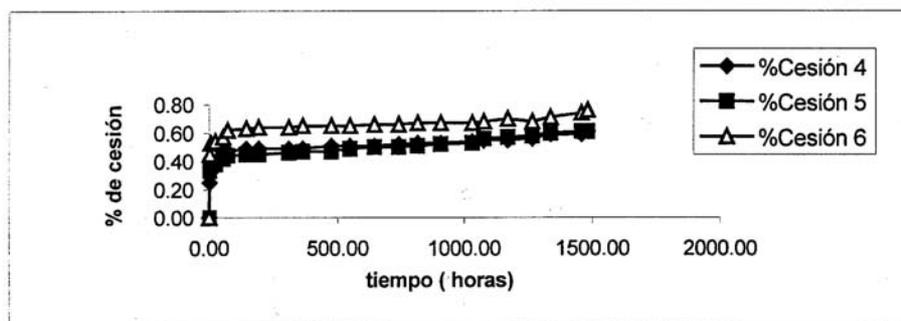


FIGURA 4.- Perfiles de cesión de los cementos que contienen ceftazidima.

En la figura 5 se muestran los perfiles de cesión correspondientes a las tres muestras de cemento que contenía cefotaxima.

FIGURA 5.- Perfiles de cesión de los cementos que contienen cefotaxima.



En vista de los perfiles de liberación se comprueba que la cesión de la ceftazidima es superior a la de la cefotaxima cuando ambas cefalosporinas se incorporan en un mismo porcentaje en el cemento óseo acrílico más utilizado, el CMW1[®] radiopaque. El porcentaje total cedido de ceftazidima fue de un 4% al cabo de las seis semanas liberación “in vitro”, mientras que en este mismo tiempo el cemento que contenía cefotaxima sólo liberó un 0,7% del antibiótico contenido. Estos bajos porcentajes de liberación de antibiótico concuerdan en cualquier caso con los porcentajes cedidos de gentamicina a partir del cemento comercial que la contiene (CMW[®] gentamicin) y que pueden ser debidos a que el poli(metilmetacrilato) es un polímero muy hidrofóbico lo que imposibilita la difusión del antibiótico a su través. La cesión del antibiótico sólo

parece ser posible a partir de las partículas de antibiótico que se encuentren en la superficie del cemento o muy próxima a ella.

CONCLUSIONES

Los métodos analíticos espectrofotométricos propuestos y validados para la determinación de ceftazidima y cefotaxima han demostrado ser lineales, repetibles y reproducibles y por lo tanto adecuados para el análisis de estas dos cefalosporinas en el estudio de liberación "in vitro" de los cementos óseos acrílicos en los que se han incorporado dichos antibióticos.

El porcentaje de cesión de la ceftazidima a partir del cemento comercial que la contiene ha sido del orden del 4,2 %, mientras que el cemento óseo acrílico de PMMA que contenía cefotaxima sólo cedió un 0,76 % del total del antibiótico incorporado. Por este motivo, en el caso de la necesidad de tratar o prevenir osteomielitis resistentes a la gentamicina, se recomienda la incorporación de ceftazidima en vez de cefotaxima en el cemento óseo acrílico para el tratamiento local de infecciones bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

El laboratorio Lilly proporcionó la ceftazidima de forma gratuita.

Este trabajo se ha subvencionado bajo el proyecto de investigación n° MAT 1999-1127-C04-02.

Bibliografía

- (1) BUCHHOLZ, H. W.; ENGELBRECHT, H.; (1970) *Chirug.* 41, 511-515.
- (2) BUCHHOLZ, H. W.; ELSON, R.A.; HEINERT, K. (1984) *Clin. Orthop.* 190, 96-108.
- (3) WHALIG, H.; DINGELDEIN, E.; (1980) *Acta Orthop. Scan.* 51, 49-56.

- (4) ADAMS, K.; COUCH, L.; CIERNY, G.; CALHOUN, J.; MADER, J.T. (1992) *Clin. Orthop. Relat. Res.* 273, 244-252.
- (5) GERHART, T.N.; ROUX, R.D.; HANFF, P.A.; HOROWITZ, G.L.; RENSCHAW, A.A.; HAYES, W.C.; (1993) *J.Orthop. Res.* 11, 250-255.
- (6) HILL, J.; KLENERMAN, L.; TRUSTEY, S.; BLOWERS, R.; (1977) *J. Bone Joint Surg.* 59B, 197-199.
- (7) Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. (2000), 1167-1191.
- (8) ISSOPOULOS, P.B.; (1988) *Analyst* 113, 1083-1086.
- (9) ISSOPOULOS, P.B.; (1989) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7, 619-625.
- (10) CASTANEDA, P.G.; JULIEN, E.; FABRE, H.; (1996) *J. Chromatogr.* 42, 159-164.
- (11) MURILLO, J.A.; LEMUS, J.M.; GARCÍA, L.F.; (1994) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12, 875-881.
- (12) FATTAH, A.; EL-WALILY, A.; AZZA, A. G.; SAIED F.B.; ESSAM, F.K. (2000) *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 22, 385-392.
- (13) ABDEL, E.; (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22, 385-392.
- (14) FRUTOS, P.; DIEZ, E.; BARRALES, J. FRUTOS, G.; (2000) *Int. J. Pharm.* 209,15-26.
- (15) TORRADO, S.; FRUTOS, P.; FRUTOS, G.; (2001) *Int. J. Pharm.* 217, 57-69.