

COMPLEXAÇÃO DA TETRACICLINA, DA OXITETRACICLINA E DA CLORTETRACICLINA COM O CATIÃO COBRE (II). ESTUDO POTENCIOMÉTRICO.

Cristina M. C. M. Couto, M. Conceição B. S. M. Montenegro e Salette Reis*

CEQUP - Departamento de Química Física - Faculdade de Farmácia do Porto - Rua Aníbal Cunha, 164 - 4050 - Porto - Portugal

Recebido em 20/4/99; aceito em 17/11/99

TETRACYCLINE, OXYTETRACYCLINE AND CHLORTETRACYCLINE COMPLEXATION WITH COPPER (II). POTENTIOMETRIC STUDY. Stability constants of complexes formed by copper (II) with three different tetracyclines (tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline) have been determined potentiometrically with an automatic system in aqueous medium at $25,0 \pm 0,2$ °C and $I = 0,1$ mol L⁻¹ NaNO₃. The protonation constants of the three tetracyclines were also determined under the same conditions. The distribution of the complexes was then simulated at therapeutic levels of the drugs.

Keywords: tetracycline; copper (II); complex formation.

INTRODUÇÃO

As Tetraciclina (TC) representam uma das mais importantes famílias farmacológicas e, tendo em conta o seu largo espectro de acção antibacteriana, são usadas, como tratamento de primeira escolha, nas infecções bacterianas causadas por *chlamydia*, *rickettsia*, *mycoplasma*, *brucella* e *spirochaetae*¹. São ainda frequentemente utilizadas em medicina veterinária, em nutrição animal e em aditivos alimentares destinados a uso pecuário.

As Tetraciclina constituem um grupo de substâncias cristalinas de natureza anfotérica, que contém um esqueleto comum, hidronaftacénico (Figura 1). Devido ao facto de, na sua estrutura química, existir um grande número de possíveis locais de ligação, as TC em solução formam, com grande facilidade, complexos metálicos. Como tal, nos fluidos biológicos, o seu mecanismo de acção é fortemente dependente da presença de iões metálicos². Alguns trabalhos anteriormente descritos na literatura mostram que, a presença de co-factores (iões metálicos) deve ser considerada na avaliação do mecanismo de acção das TC em sistemas biológicos, embora o seu papel no desenvolvimento da acção antibacteriana ainda não esteja bem definido. O conhecimento das interacções sofridas por estes antibióticos com metais poderá ajudar a melhor compreender a sua actuação em mecanismos fisiológicos específicos, bem como a planear métodos de doseamento mais eficazes e rápidos, que possam competir favoravelmente com os métodos oficiais^{3,4}.

A importância do estudo das interacções desta família de compostos com o catião cobre deve-se ao facto de este metal estar presente em concentrações apreciáveis, quer nos fluidos biológicos quer em preparações multivitamínicas, usualmente administradas durante tratamentos com antibióticos. Além disso, o recurso a métodos de doseamento, baseados na formação de complexos corados das TC com o catião Cu (II) tem sido frequentemente proposto⁵⁻⁸. As propriedades complexantes desta família de drogas têm sido muito estudadas anteriormente contudo, os valores das constantes de estabilidade correspondentes à formação de complexos entre o ião cobre (II) e as TC descritos na literatura não são concordantes⁹⁻¹¹ e nem sempre consideram a existência das mesmas espécies em solução aquosa razão, pela qual estas devem ser reavaliadas.

O trabalho apresentado teve como objectivo a determinação das constantes de estabilidade dos complexos formados pelo catião Cu (II) e três tetraciclina (tetraciclina - TCH, oxitetraciclina - OTCH e clortetraciclina - CTCH). As constantes de estabilidade foram determinadas por titulação potenciométrica usando um eléctrodo de vidro em condições experimentais análogas às utilizadas na determinação das constantes de acidez de cada uma das tetraciclina. Os dados experimentais foram analisados com os programas Superquad¹² e Best¹³.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água bidesionizada, isenta de CO₂, (condutividade específica < 0,1 μS cm⁻¹) e com reagentes de qualidade pro-análise ou semelhante, sem qualquer purificação adicional.

A solução de HNO₃, de concentração 0,1000 mol L⁻¹ foi obtida a partir de ampola Titrisol (Merck 9973). As soluções de NaOH, isentas de carbonato, foram mantidas em atmosfera de N₂ e padronizadas por titulação potenciométrica.

As soluções mãe das Tetraciclina (TC), obtidas na forma de cloridratos (Sigma), foram preparadas diariamente por pesagem rigorosa do respectivo sólido, sendo mantidas, entre os ensaios, no frigorífico ao abrigo da luz.

A solução de nitrato de cobre foi preparada a partir de uma solução padrão de cobre, de concentração 0,1 mol L⁻¹ da ORION (Ref. 942906).

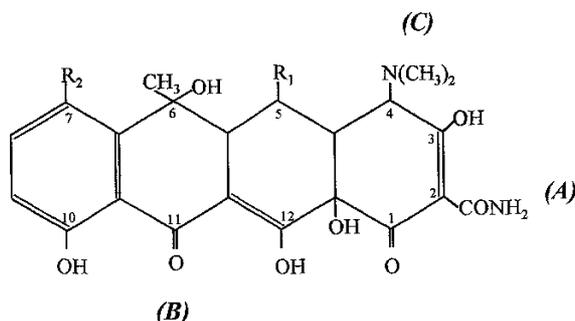


Figura 1. Estrutura química da tetraciclina (TC).

Determinação potenciométrica das constantes de acidez e estabilidade

As medidas potenciométricas foram efectuadas num sistema automático constituído por um potenciómetro Crison 2002 (sensibilidade de $\pm 0,1$ mV), uma microbureta Crison 2031, comandados por um micro-computador que permitia o controlo dos ensaios e a aquisição dos dados e ainda o tratamento matemático dos dados experimentais. A célula electrolítica usada era constituída por um eléctrodo de dupla junção AgCl / Ag, ORION 90-00-02 (como solução de referência externa usou-se uma solução de NaNO_3 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e um eléctrodo de vidro, Russel SWL. A temperatura dos ensaios foi mantida constante a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ fazendo circular água termostatzada por uma cuba de dupla parede, Crison. Todas as titulações foram efectuadas em atmosfera de azoto, fazendo borbulhar inicialmente o azoto na solução a titular. A calibração do sistema foi feita usando, o método de Gran¹⁴, em termos da concentração de iões hidrogénio, por titulação de ácido forte/base forte [HNO_3 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$)/ NaOH isento de carbonato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$)] com força iónica ajustada a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3 .

As constantes de acidez das TC foram determinadas por titulação de $20,00 \text{ mL}$ de uma solução aquosa ($I = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3) de Tetraciclina ($\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em TC e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em HNO_3) com uma solução de $\text{NaOH} \approx 0,02 \text{ mol L}^{-1}$. As constantes de estabilidade dos complexos Cu (II) / TC foram determinadas por titulação potenciométrica de $20,00 \text{ mL}$ de uma solução aquosa ($I=0,1 \text{ mol L}^{-1}$, NaNO_3) de Tetraciclina ($\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em TC, $\approx 1 \times 10^{-3}$ em $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em HNO_3) com uma solução de $\text{NaOH} \approx 0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Foram efectuados ensaios variando a razão de concentrações Cu / TC (1:1; 1:2 e 2:1).

Os cálculos foram efectuados com os dados obtidos em pelo menos seis titulações independentes, cada uma das quais com pelo menos 20 pontos experimentais usando os programas para computador Superquad¹² e Best¹³. Em todos os modelos utilizados para os cálculos considerou-se a existência dos equilíbrios correspondentes às protólises dos ligandos e do ião cobre (II). Os erros associados aos valores das constantes apresentados neste trabalho foram calculados pelo método proposto por Albert e Sergeant¹⁵ no qual o erro é igual à diferença máxima entre o logaritmo da média dos logaritmos dos valores de constantes calculados nos vários ensaios e os seus valores individuais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constantes de acidez das TC

As constantes de acidez determinadas para a TCH, OTCH e

CTCH nas condições experimentais referidas anteriormente neste trabalho e o intervalo de pH usado na aquisição dos dados são apresentadas na Tabela 1. Para as tetraciclinas estudadas (LH_3^+Cl^- representa a forma protonada) os dados experimentais foram obtidos no intervalo de pH de 2,5 a 10,0. Os valores de pK_a para a TCH e seus derivados são extensivamente descritos na literatura (Tabela 2) e os valores descritos são muito semelhantes aos apresentados neste trabalho^{11,16-19}. As constantes de acidez destes compostos são usualmente atribuídas à dissociação do grupo tri-carbonil metano (sistema amídico) (A) para pK_{a1} , à dissociação do sistema fenol-dicetona (B) para pK_{a2} e à ionização do grupo dimetil amónio (C) para pK_{a3} (Figura 1)^{11,16}.

Tabela 2. Constantes de acidez das tetraciclinas CTCH, OTCH e TCH.

Ião	p	q	r	Espécies	CTCH	OTCH	TCH
H^+	1	0	-1 ^a	$[\text{H}_2\text{L}]$			3,36 ¹⁶
	1	0	-2 ^a	$[\text{HL}]^-$			11,86 ¹⁶
	1	0	-3 ^a	$[\text{L}]^{2-}$			22,32 ¹⁶
	1	0	-1	$[\text{H}_2\text{L}]$			2,78 ¹¹
	1	0	-2	$[\text{HL}]^-$			10,33 ¹¹
	1	0	-3	$[\text{L}]^{2-}$			19,81 ¹¹
	1	0	-1 ^a	$[\text{H}_2\text{L}]$	3,24 ¹⁷	3,16 ¹⁷	3,26 ¹⁷
	1	0	-2 ^a	$[\text{HL}]^-$	10,49 ¹⁷	10,53 ¹⁷	10,04 ¹⁷
	1	0	-3 ^a	$[\text{L}]^{2-}$	—	—	—
1	0	-1 ^b	$[\text{H}_2\text{L}]$	3,30 ¹⁸	3,27 ¹⁸	3,30 ¹⁸	
	0	-2 ^b	$[\text{HL}]^-$	10,74 ¹⁸	10,59 ¹⁸	10,98 ¹⁸	
	0	-3 ^b	$[\text{L}]^{2-}$	—	—	—	
	0	-1 ^b	$[\text{H}_2\text{L}]$	3,27 ¹⁹	—	3,33 ¹⁹	
	0	-2 ^b	$[\text{HL}]^-$	10,59 ¹⁹	—	10,03 ¹⁹	
	0	-3 ^b	$[\text{L}]^{2-}$	—	—	—	

^a Força iónica fixada a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

^b Valores de pK_a extrapolados para força iónica zero.

Complexos de Cobre (II) com as TC

Muitos têm sido os trabalhos realizados anteriormente com o objectivo de conhecer e quantificar as propriedades complexantes desta família de drogas de forma a relacioná-las com a actividade biológica contudo, os valores das constantes de estabilidade correspondentes à formação de complexos entre o ião cobre (II) e as TC descritos na literatura não são concordantes e nem sempre consideram a existência das mesmas espécies em solução aquosa, pelo que devem ser reavaliadas⁹⁻¹¹.

Tabela 1. Constantes de acidez e complexação calculadas para soluções aquosas de Cobre (II) / TC.

Ião	p	q	r	Espécies Possíveis	ΔpH	$\log \beta$		
						CTCH	OTCH	TCH
H^+	1	0	-1	$[\text{H}_2\text{L}]$	2,5-10,0	-3,29 \pm 0,03	-3,34 \pm 0,02	-3,42 \pm 0,02
	1	0	-2	$[\text{HL}]^-$	2,5-10,0	-10,54 \pm 0,02	-10,74 \pm 0,03	-11,01 \pm 0,02
	1	0	-3	$[\text{L}]^{2-}$	2,5-10,0	-19,62 \pm 0,06	-19,89 \pm 0,06	-20,10 \pm 0,07
Cu^{2+}	1	1	-1	CuH_2L	2,8-7,5	0,73 \pm 0,06	—	0,48 \pm 0,09
	1	1	-2	CuHL	2,8-7,5	-2,93 \pm 0,06	-2,84 \pm 0,05	-2,60 \pm 0,08
	1	1	-3	CuL	2,8-7,5	-9,27 \pm 0,06	-9,40 \pm 0,05	-8,55 \pm 0,06
	2	1	-2	CuH_4L_2	2,7-9,0	0,85 \pm 0,10	0,70 \pm 0,07	0,51 \pm 0,09
	2	1	-3	CuH_3L_2	2,7-9,0	-2,55 \pm 0,10	-3,33 \pm 0,09	-2,55 \pm 0,09
	2	1	-4	CuH_2L_2	2,7-9,0	-7,53 \pm 0,09	-7,58 \pm 0,08	-7,52 \pm 0,08
	2	1	-5	CuHL_2	2,7-9,0	-15,90 \pm 0,10	-17,35 \pm 0,08	-14,82 \pm 0,08
	2	1	-6	CuL_2	2,7-9,0	—	-26,37 \pm 0,09	—

Os símbolos p , q e r são usados nos programas para indicar os coeficientes estequiométricos associados com os possíveis equilíbrios em solução.: p , coeficiente do ligando, q , cobre (II), e r , protões.

As TC reagem com o cobre (II) formando complexos estáveis. O cobre (II), (d9) é a forma mais estável em solução aquosa tendo o $\text{Cu}_{\text{aq}}^{2+}$ uma estrutura octaédrica distorcida formando preferencialmente complexos com geometria octaédrica, embora também possam existir complexos tetraédricos. Nos complexos com o íon cobre (II), os átomos doadores dos ligandos estão, normalmente ligados no plano tetragonal (equatorial) sendo menor a tendência de coordenação nas posições axiais e por esta razão usualmente coordena com quatro átomos doadores, embora, por vezes, coordene com cinco átomos, sendo as restantes posições ocupadas por moléculas do solvente^{20,21}.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores das constantes de estabilidade ($\log\beta$) determinados para os complexos de cobre (II) com a TCH, OTCH e CTCH, assim como o intervalo de pH no qual se obtiveram os dados experimentais.

Para o sistema binário Cu (II) / TC o modelo que melhor corresponde aos dados obtidos assume a presença em solução das seguintes espécies de cobre (II): para TCH e CTCH, $[\text{CuH}_2\text{L}]^{2+}$, $[\text{CuHL}]^+$, $[\text{CuL}]$, $[\text{CuH}_4\text{L}_2]^{2+}$, $[\text{CuH}_3\text{L}_2]^+$, $[\text{CuH}_2\text{L}_2]$ e $[\text{CuHL}_2]^-$ e para OTCH, $[\text{CuHL}]^+$, $[\text{CuL}]$, $[\text{CuH}_4\text{L}_2]^{2+}$, $[\text{CuH}_3\text{L}_2]^+$, $[\text{CuH}_2\text{L}_2]$, $[\text{CuHL}_2]^-$ e $[\text{CuL}_2]^{2-}$; nestas fórmulas H_2L representa a forma neutra das TC.

Os resultados obtidos para as três tetraciclinas estudadas são semelhantes entre si, com a excepção da espécie $[\text{CuL}_2]^{2-}$ que só foi determinada para a OTCH.

Na Figura 2 representam-se as curvas de titulação potenciométrica com NaOH de uma solução de TCH de concentração $\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e de uma solução de TCH de concentração $\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ de concentração $\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ambas com força iónica ajustada a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3 . A diferença existente na variação dos valores de pH ao longo da titulação para as duas soluções deve-se à formação de novas espécies em solução, resultantes de interações entre a TCH e o catião cobre (II), com a consequente libertação de iões H^+ que se traduz por uma diminuição do pH relativamente à curva correspondente à solução de TC na ausência de Cu (II). Esta diferença começa a ser significativa para os valores de pH próximos de 2, valor que corresponde ao pH acima do qual há formação de complexos entre o ligando e o catião cobre (II), como pode ser observado na Figura 3, que representa o diagrama de distribuição das espécies presentes em solução em função do pH.

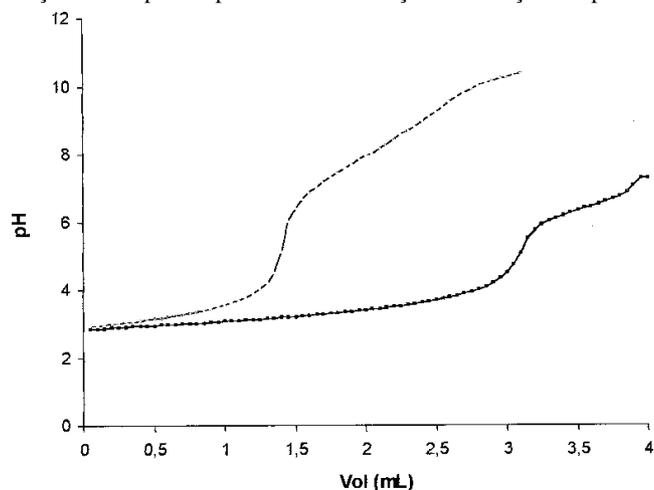


Figura 2. Curvas de titulação potenciométrica com NaOH de uma solução de TCH ($\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) (●) e de uma solução de TCH ($\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ($\approx 7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) (■).

Como o valor do $\text{pK}_{\text{a}1}$ da TCH é de 3,42, soluções aquosas de $\text{pH} \approx 3$, contêm como espécie predominante a TCH na forma neutra (H_2L) e o complexo com o íon cobre (II) que se forma corresponde a $\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2$. Nestas condições, o ligando

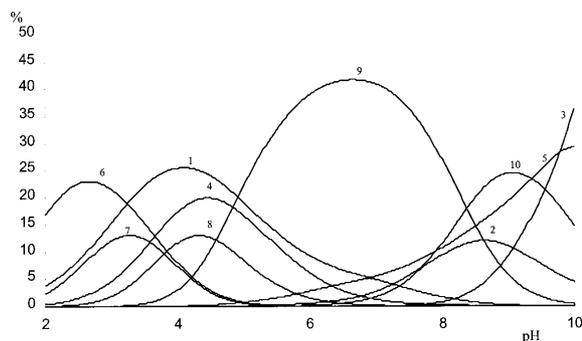


Figura 3. Diagrama de distribuição das espécies em função do pH. 1 - H_2L ; 2 - HL ; 3 - L^{2-} ; 4 - CuHL ; 5 - CuL ; 6 - CuH_2L ; 7 - CuH_4L_2 ; 8 - CuH_3L_2 ; 9 - CuH_2L_2 ; e 10 CuHL_2 .

actua provavelmente como monodentado. Maior evidência para o comportamento monodentado do ligando na forma neutra pode ser obtida pela aplicação do método $\Delta \log K$ ²⁰, no qual

$$\Delta \log K = \log K_{\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})}^{\text{Cu}} - \log K_{\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)}^{\text{Cu}}$$

aos complexos de cobre (II) presentes em solução. O valor calculado de $\Delta \log K = -0,5$, para TCH, situa-se no intervalo $-0,5$ e $-0,8$, característico de um tipo de ligação monodentada, enquanto que o intervalo dos valores característicos para ligandos bidentados é -1 e -2 . O valor da constante de complexação correspondente à formação da espécie $\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})$ determinado neste trabalho (3,90) é inferior ao descrito na literatura (4,29)⁹.

Os valores de $\text{pK}_{\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})}^{\text{Cu}}$ encontrados (OCTH 7,38, CTH 8,18 e TCH 7,35) são semelhantes aos descritos na literatura (OCTH 6,0 e TCH 7,31)⁹. No caso da CTCH não se encontra descrito na literatura nenhum valor correspondente a esta constante.

No diagrama de distribuição das espécies em função do pH (Fig.3), verifica-se também, que para valores superiores a $\text{pH} = 3$ e inferiores a $\text{pH} = 7$ os complexos de cobre (II) predominantes em solução são CuHL e CuH_3L_2 . Os valores de $\text{pK}_{\text{CuL}}^{\text{Cu}}$ encontrados (OCTH 7,90 e CTH 7,61 e TCH 8,41) são semelhantes aos descritos na literatura. (OCTH 8,96 e CTH 7,59 e TCH 8,88)⁹.

A concentração máxima da espécie CuH_2L_2 aparece em solução para um valor de $\text{pH} \approx 6,5$. Os valores de $\text{pK}_{\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)}^{\text{Cu}}$ encontrados (OTCH 13,40, CTH 13,55 e TCH 14,50) são semelhantes aos descritos na literatura. (CTH 11,36 e TCH 13,26)⁹, no entanto não aparece descrito na literatura nenhum valor no caso da OTCH.

As três tetraciclinas actuam provavelmente como ligandos bidentados estabelecendo-se a ligação através do sistema fenólico - dicetona ($\text{C}_{10}\text{-C}_{11}\text{-C}_{12}$) (B), formando um quelato de seis membros¹⁰. No complexo CuH_2L_2 , os ligandos (HL) coordenam, provavelmente, o íon metálico como um ligando bidentado, originando uma estrutura planar-quadrática com o catião cobre na qual duas moléculas de água poderão coordenar fracamente nas posições axiais. Além disso, para confirmar o comportamento bidentado das tetraciclinas na forma desprotonada, pode recorrer-se à aplicação do método de $\Delta \log K$ ²⁰, no qual

$$\Delta \log K = \log K_{\text{Cu}(\text{HL})_2}^{\text{Cu}} - \log K_{\text{Cu}(\text{HL})}^{\text{Cu}}$$

aos seus complexos de cobre presentes em solução. Os valores de $\Delta \log K$ calculados nos três casos, OCTH $\Delta \log K = -1,9$; para TCH $\Delta \log K = -2,32$ e para CTH $\Delta \log K = -1,55$, encontram-se no intervalo -1 e -2 característico da coordenação de ligandos bidentados com o íon cobre.

Os resultados obtidos potenciometricamente, permitem, com base no conhecimento da estrutura química do ligando e do íon

metálico, fazer alguns comentários sobre a estrutura dos complexos formados e, embora não exista descrita, uma opinião consensual quanto ao local de coordenação das TC, relacionando com os referidos na literatura a partir de dados obtidos por diferentes técnicas.

Estudos realizados anteriormente por Day²², usando técnicas baseadas em fluorescência e dicroísmo circular, sugerem que, em solução, ocorre quelatação no sistema dicetónico (C₁₀, C₁₁, C₁₂, Fig.1) das TC. Conover²³, baseado em dados obtidos por espectrofotometria, concluiu que o local para ligação das TC a metais se situava no grupo enolizado β-dicetónico em C₁₁ - C₁₂, hipótese também confirmada por estudos de espectrometria de infra-vermelho realizados por Hassam¹⁰. Nos trabalhos referidos, admite-se que as tetraciclinas funcionam como ligandos bidentados que formam quelatos com o catião cobre (II), e da análise dos diagramas de distribuição (Figura 3) infere-se que as espécies correspondentes a este tipo de complexos (CuH₂L₂, CuHL₂) existem em solução em concentrações significativas para valores de pH ≈ pKa ± 1, o que permite admitir que a espécie formada na segunda protólise está envolvida na formação deste complexo. No mesmo diagrama de distribuição, verifica-se que para soluções de pH correspondentes à terceira protólise (pH≈9) a concentração destes complexos é inferior à que existe para valores de pH menores, o que sugere que o grupo dimetilamino não está envolvido nesta coordenação. A teoria da ligação ao grupo-A proposta por Mitscher²⁴ e Doluisio²⁵ sugere que a quelatação ocorre no grupo dimetilamino, entre C₄ e o átomo de oxigénio do grupo hidroxilo em C_{12a} ou C₃. De acordo com Baker²⁶, baseado em estudos de espectrometria de reflectância, o grupo dimetilamino não intervem na coordenação, e a quelatação ocorreria por intermédio dos átomos de oxigénio, provavelmente do sistema (A).

Os valores das constantes de complexação correspondentes à formação da espécie CuL (OCTH 10,49 e CTH 10,35) são semelhantes aos encontrados na literatura: (OCTH 12,44 e CTH 10,68)⁹. Para o caso da TCH o valor encontrado foi de 11,55 não se encontrando descrito na literatura nenhum valor para efeito de comparação. Esta espécie existe em solução para valores de pH superiores a 7,5 pois a estes valores de pH começa a ser significativa a concentração da espécie totalmente desprotonada correspondente às tetraciclinas.

Para todas as tetraciclinas estudadas foi determinado o valor da constante de estabilidade correspondente à formação de CuHL₂ e, pela análise do diagrama de distribuição das espécies existentes em solução em função do pH, verifica-se que a concentração máxima desta espécie em solução se verifica para valores de pH próximos de 7,5.

O valor da constante de complexação correspondente à formação de CuL₂ para a espécie OTCH determinado (13,41) é inferior ao descrito na literatura (15,34)⁹. Para as outras tetraciclinas estudadas não aparecem valores na literatura correspondentes a esta constante. Este valor é pequeno relativamente ao do complexo CuL, o que poderá dever-se à formação dum complexo de cobre (II) com um ligando tridentado, onde

as moléculas de água das posições axiais poderão ser substituídas por uma das funções do ligando.

AGRADECIMENTOS

C.M.C.M.C agradece a bolsa de doutoramento concedida (Praxis XXI BD/4072/94).

REFERÊNCIAS

1. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th Edition, The Philadelphia College of Pharmacy and Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1985.
2. Sachan, N. P.; Gupta, C.M.; *Talanta* **1980**, *27*, 457.
3. *The British Pharmacopoeia*, HMSO, London, 1988.
4. *The United States Pharmacopoeia*, 21st revision, Easton PA, Mack Printing Company, (USP XXI) 1985.
5. Paz, J. L. L.; Calatayud, J. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 1093
6. Saha, U.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1987**, *70*, 686
7. Saha, U.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1989**, *72*, 242.
8. Couto, C. M. C. M.; Lima, J. L. F. C.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Reis, S.; *J. Pharm. Biomed. Analysis* **1998**, *18*, 527.
9. Brion, M.; Lambs, L.; Berthon, G.; *Inorg. Chim. Acta* **1986**, *123*, 61.
10. Hassan, S. S. M.; Amer, M. M.; Ahmed, S. A.; *Mikrochim. Acta* (Wien) **1984**, *III*, 165.
11. Ghandour, M. A.; Azab, H. A.; Hassan, A.; Ali, A. M.; *Monatshefte fur Chemie* **1992**, *123*, 51.
12. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1985**, 1195.
13. Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; VCH, Weinheim 1988.
14. Gran, G.; *Analyst* **1952**, *77*, 661.
15. Albert, A.; Sarjaent, E.P.; *The determination of Ionization Constants*, 2nd Edition, Chapman and Hall, London 1971.
16. Ghandour, M. A.; Azab, H.A.; Hassan, A.; Ali, A. M.; *Polyhedron* **1989**, *8*, 189.
17. Ahmed, B. M.; Jee, R. D.; *Anal. Chim. Acta* **1984**, *166*, 329.
18. Stephens, C. R.; Murai, K.; Brunings, K. J.; Woodward, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4155.
19. Benet, L. Z.; Goyan, J. E.; *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 983.
20. Sigel, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 394.
21. Nagypál, I.; Gergely, A.; Farkas, E.; *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1974**, *36*, 699.
22. Day, S. T.; Crouthamel, W. G.; Martinelli, L. C.; Ma, J. K. H.; *J. Pharm. Sci.* **1978**, *67*, 1518.
23. Conover, L. H.; *Nature* **1956**, *177*, 1059.
24. Mitscher, L. A.; Bonnaci, A. C.; Sokoloski, T. D.; *Tetrahedron Lett.* **1968**, *51*, 5361.
25. Doluisio, J. T.; Martin, A. N.; *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 16.
26. Baker, W. A.; Brown, P. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1314.