

ARS PHARMACEUTICA

REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tomo XIX - Núm. 3

1978

Consejo de Redacción

Director:

Prof. Dr. D. Jesús Cabo Torres

Director Ejecutivo:

Prof. Dr. D. José Luis Valverde

Vocales:

Prof. Dr. D. Alberto Ramos
Cormenzana

Prof. Dr. D. Fermín Sánchez
de Medina Contreras

Prof. Dra. María A. López
Prof. Dr. D. Diego Carlos
Guevara Benítez

Prof. Dr. D. José Jiménez
Martín

Secretario de Redacción:

Prof. Dr. D. Luis Bravo Díaz

Redacción y Administración:

Facultad de Farmacia.
Granada - España.

Dep. Legal. GR: núm. 17-1960

Imprime:

Gráficas del Sur, S. A.
Boquerón, 6
Granada 1978.

Sumario

PAG.

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

- Estudio espectrofluorimétrico de la cinética de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico, por F. Martínez, M. Sánchez y J. Thomas 245
- Hipoglucemiantes.—Altramuz (*Lupinus albus* L.). III. Relación dosis-efecto y termoestabilidad, por Cabo, J.; Bravo, L.; Jiménez, J. y Marhuenda, E. 257
- Solubilidades de tetrafenilboratos de aminas simpatomiméticas, por G. Crovetto, L. Crovetto y J. Thomas... .. 263
- Morfología y biometría de las distintas fases del ciclo biológico de *ptilonyssus ruandae sylviae*, Fain 1963 (Acari: Mesostigmata), por Guevara-Benítez, D. y Ubeda-Ontiveros, J. M. 271
- Juan de Moya Salazar, Boticario Real (1674-1701), por José Luis Valverde y M.^a Carmen Sánchez Téllez 291

TRABAJOS DE COLABORACION

- Inhibición de la ureasa por pesticidas, por Montiel, M.; Hermoso, R.; Monteoliva, M. 325
- Crítica de Libros 333

TRABAJOS ORIGINALES DE LA FACULTAD

DEPARTAMENTO DE FISICOQUIMICA FARMACEUTICA

ESTUDIO ESPECTROFLUORIMETRICO DE LA CINETICA DE LA HIDROLISIS DEL ACIDO ACETILSALICILICO

F. MARTÍNEZ, M. SÁNCHEZ y J. THOMAS

RESUMEN

Se ha medido la constante de velocidad de la hidrólisis del ácido acetil-salicílico a las temperaturas de 17°, 30° y 40°C en el intervalo de pH de 0,3 a 12,5, mediante la determinación espectrofluorimétrica del ácido salicílico liberado. La reacción sigue una cinética de primer orden. La comparación de los resultados a 17°C con los obtenidos por investigadores previos muestra una buena concordancia. Suponiendo un mecanismo propuesto anteriormente se han calculado las energías de activación de cuatro reacciones que contribuyen al proceso.

SUMMARY

The rate of the aqueous hydrolysis of the acetylsalicylic acid has been measured at the temperatures of 17°, 30° and 40°C over the pH range 0,3 to 12,5, by determining the liberated salicylic acid spectrophotofluorimetrically.

The reaction follows a first-order kinetics. A comparison of the results at 17°C with those obtained by previous investigators shows good agreement. Assuming a mechanism anteriorly proposed, the activation energies of four contributing reactions have been calculated.

RESUME

On a mesuré le constante de vitesse de l'hydrolyse de l'acide acetylsalicylique à le temperature de 17°, 30° et 40°C dans un intervalle de pH compris entre 0,3 et 12,5, d'après la determination spectrofluorométrique de l'acide salicyllique liberé. La reaction sut une cinétique de premier ordre. La comparaison des résultats à 17°C avec ceux obtenus par d'autres chercheurs montre une bonne similitude. En se basant sur le mécanisme proposé anterieurement, on a calculé les énergies d'activation de quatre re- actions qui contribuent au processus.

INTRODUCCION

El ácido acetilsalicílico, más conocido como "aspirina" (*), continúa siendo actualmente una de las drogas más usadas, a pesar del tiempo transcurrido desde su introducción comercial, incluso después del advenimiento de modernos agentes terapéuticos.

Uno de los problemas más importantes planteados es la inestabilidad del ácido acetilsalicílico en los preparados farmacéuticos que contienen tal sustancia. La descomposición del ácido acetilsalicílico se debe a la hidrólisis del grupo éster.

Sin embargo, se trata de una reacción muy compleja, de gran interés desde el punto de vista químico, a la que se han dedicado gran número de publicaciones.

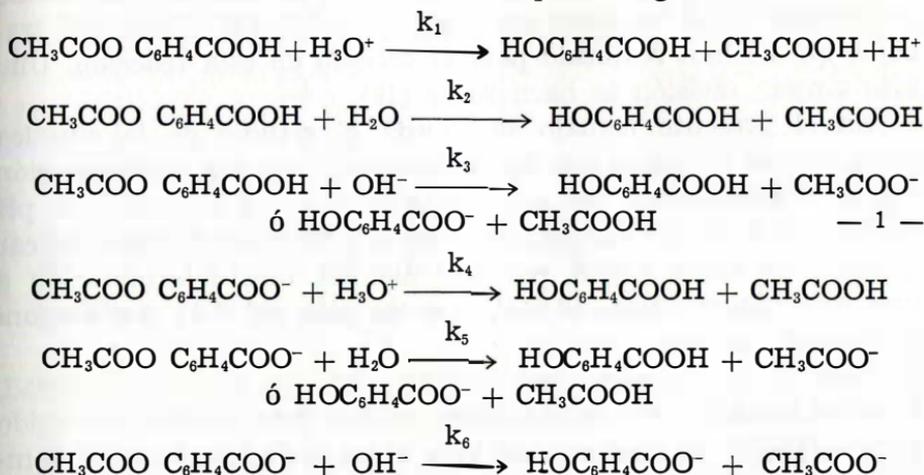
El primer trabajo sobre esta hidrólisis fue hecho por Rath (1) quien operó a una temperatura muy alta, 100° C, y determinó la velocidad de la reacción mediante la titulación de la acidez total a intervalos de tiempo determinados. Los valores encontrados indicaron una reacción de primer orden. Tsakalotos y Horsch (2) siguieron de modo análogo la hidrólisis, pero a temperaturas más razonables (20°, 50° y 60° C). Wolf (3) estudia el efecto catalítico del ión hidrógeno. Morton (4) solubilizó el ácido acetilsalicílico en agua a temperatura ambiente con ayuda de citratos y acetatos de potasio y sodio y siguió la hidrólisis mediante titulación con álcali.

La Mer y Greenspan (5) efectuaron la hidrólisis en medio alcalino a $25,000 \pm 0,005^\circ \text{C}$, mostrando que en estas condiciones la cinética es de segundo orden. Sturtevant (6) determinó calorimétricamente la velocidad de saponificación a 35° C.

Un estudio completo y minucioso sobre la cinética de esta reacción ha sido realizado por Edwards (7) (8). En el primero de estos trabajos se sigue la hidrólisis de disoluciones diluidas de ácido acetilsalicílico ($3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) mediante espectrofotometría ultravioleta, determinándose la constante de velocidad de reacción en función del pH a 17° C. La representación gráfica de $\log k$ frente al pH, muestra que la hidrólisis es catalizada apreciablemente por el ión hidrógeno y muy fuertemente por el ión hidróxilo. En

(*) Mantenemos este nombre por ser el aceptado corrientemente en la mayoría de los países, aún después de expirar su patente comercial.

el intervalo de pH de 5-8 la velocidad es constante. En el intervalo de pH de 2-3 hay un mínimo pronunciado, donde la velocidad es menos de un cuarto del valor estacionario. Edwards explicó la relación entre la constante de velocidad y el pH suponiendo que la citada hidrólisis tiene lugar a través de seis reacciones simultáneas como indica el esquema siguiente:



Para fines prácticos (8) la hidrólisis viene controlada fundamentalmente por las reacciones 1, 4, 5 y 6 deduciendo Edwards la siguiente expresión para la constante de velocidad

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 C_{\text{H}^+} + k_2 C_{\text{H}_2\text{O}} + k_3 C_{\text{OH}^-}}{1 + \frac{K}{C_{\text{H}^+}}} - \frac{k_4 C_{\text{H}^+} + k_5 C_{\text{H}_2\text{O}} + k_6 C_{\text{OH}^-}}{1 + \frac{C_{\text{H}^+}}{K}} \quad - 2 -$$

en donde K es la constante de disociación del ácido acetilsalicílico.

En el segundo de los trabajos citados (8), Edwards estudió la influencia de la temperatura, efectuando medidas entre 10° y 50° C, y calculó los valores de k_1 , k_4 , k_5 y k_6 en función de la temperatura y las correspondientes energías de activación de las cuatro reacciones. Garrett (9) (10) extendió el trabajo de Edwards incluyendo varios acil salicilatos. La acción de diversos aditivos en la hidrólisis del ácido acetilsalicílico ha sido estudiada por numerosos autores, entre los que cabe citar a Okano y Kojima (11), Blaug y Wesolowski (12), Nogami y otros (13), Santo-

padre y Bolton (14), Murthy y Rippie (15) y Kornblum y Zo-glio (16).

Muy interesante es el trabajo de Fersht y Kirby (17) que estudiaron la hidrólisis de una serie de derivados del ácido acetilsalicílico, y sugieren el mecanismo de catálisis básica general.

En todo lo dicho anteriormente sobre la hidrólisis del ácido acetilsalicílico se ha dado un bosquejo sobre los numerosos trabajos que se han realizado para el estudio de esta reacción. Una más amplia revisión la hace Kelly (18).

En el presente trabajo se aborda el estudio de la cinética formal de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico por determinación espectrofluorimétrica del ácido salicílico en el intervalo de pH de 0,3 a 12,5 y a las temperaturas de 17°, 30° y 40° C. Cabe indicar que sólo se había hecho, por este método, una determinación a una sola temperatura, 18,5° C, y a un sólo pH 9,42 por Ferroni y Baistocchi (19).

Este método espectrofluorimétrico, permite trabajar con disoluciones mucho más diluidas de ácido acetilsalicílico, lo cual supone una ventaja dada su escasa solubilidad en agua. Así nosotros hemos partido de disoluciones $2 \cdot 10^{-4}$ M de ácido acetilsalicílico, mientras que en las determinaciones espectrofotométricas las concentraciones más bajas empleadas (7) eran de $3 \cdot 10^{-3}$ M.

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Instrumentación y reactivos

Las determinaciones de fluorescencia se han realizado en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-3L. Las medidas de pH se efectuaron en un pH-meter 26 Radiometer. La temperatura se controló en un termostato con una precisión de $\pm 0,1^\circ$ C.

El ácido acetilsalicílico y el ácido salicílico fueron de alto grado de pureza como se comprobó mediante las medidas de constantes fisicoquímicas.

Propiedades fluorescentes del ácido salicílico

El ácido salicílico presenta propiedades fluorescentes en función del pH, debido a las diferentes formas iónicas y no disocia-

das del mismo. Para pH superiores a 1,5 se sabe que el ácido salicílico tiene un máximo de emisión a 404 nm. En cambio, para pH inferiores a 1,5 la fluorescencia es mucho más pequeña y hemos encontrado que presenta un máximo de emisión a 440 nm no descrito anteriormente.

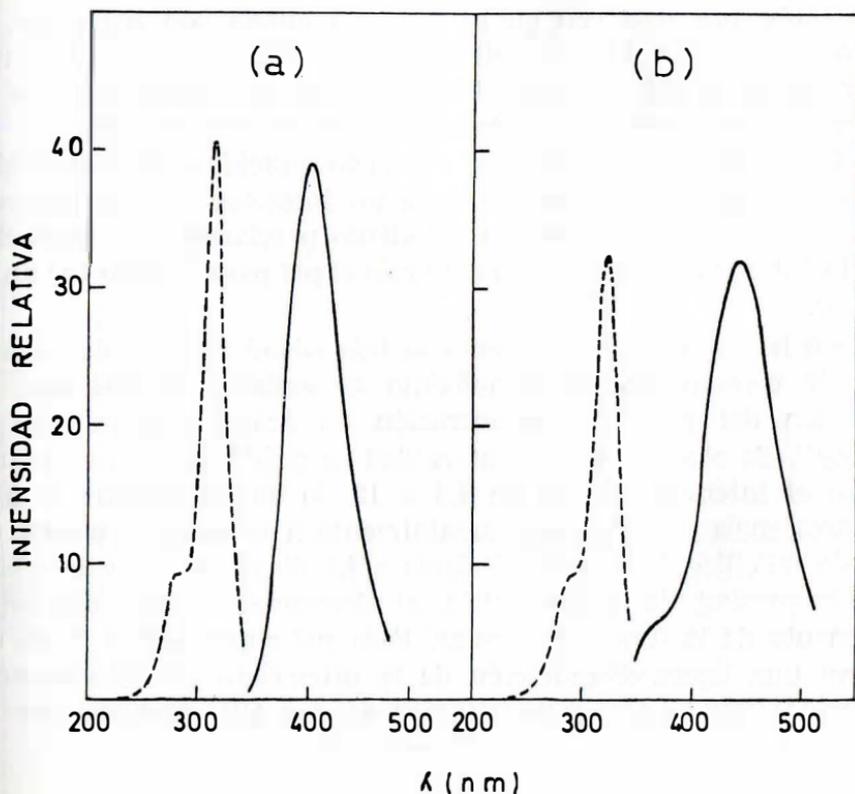


Fig. 1.—Espectros no corregidos de excitación (— — —) y de fluorescencia (————) del ácido salicílico. Curva (a) para pH igual a 5,0. Curva (b) para pH igual 0,70.

En la figura 1 se presentan los espectros no corregidos de excitación y de fluorescencia del ácido salicílico, (a) para un pH de 5,0 y (b) para un pH de 0,70. En ambos casos se emplearon concentraciones de 10 mg/l. Las curvas de trazo discontinuo corresponden al espectro de excitación y las curvas continuas al espectro de fluorescencia. Se observa que el espectro de excitación presenta un máximo a 320 nm tanto en el caso (a) como en

el (b). Asimismo, presentan un máximo mucho menos pronunciado a 290 nm.

Para los espectros de excitación las longitudes de onda de emisión fueron de 404 y 440 nm para (a) y (b) respectivamente. Para los espectros de fluorescencia la longitud de onda fue de 320 nm en ambos casos. A pesar de que las intensidades de fluorescencia que aparecen en la figura 1 citada son parecidas, la fluorescencia del ácido salicílico a pH 5 (Fig. 1 a) es muy superior que para pH 0,70 (Fig. 1 b), pues en este último caso se ha operado con rendijas superiores y a mayor sensibilidad.

Como las determinaciones de ácido salicílico en la reacción objeto de estudio se hicieron para un intervalo de pH comprendido entre 0,5 y 12,5, hemos estudiado previamente la variación de la intensidad de fluorescencia con el pH para el caso (a) antes dicho.

En la figura 2 se representa la intensidad relativa de fluorescencia correspondiente al máximo de emisión de 404 nm, en función del pH. La concentración de ácido salicílico fue de 2 mg/l. Se observa que la intensidad es prácticamente constante para el intervalo de pH de 4,5 a 12, lo que demuestra que la fluorescencia se debe fundamentalmente a la forma ionizada del ácido salicílico. Para pH inferiores a 4,5 disminuye sensiblemente la intensidad de fluorescencia al descender el pH, debido al aumento de la forma molecular. Para pH superiores a 12 se observa una ligera disminución de la intensidad de fluorescencia, debido a que la alta concentración del ión OH^- produce una inhibición (Quenching) de la fluorescencia.

Determinación de la constante de velocidad de la reacción

Se ha determinado la constante de velocidad a tres temperaturas 17° 30°, y 40° C. La forma operatoria fue la siguiente. Se prepara una disolución de ácido acetilsalicílico al pH al cual se quiere determinar la constante de velocidad. La concentración fue siempre de $2,0 \cdot 10^{-4}$ M. Se reparte esta disolución en unos 12 a 20 matraces con cierre esmerilado, que inmediatamente se coloca en un termostato previamente regulado a la temperatura de operación. A intervalos de tiempo determinados —variables según el pH elegido, ya que la velocidad es función del pH—, se

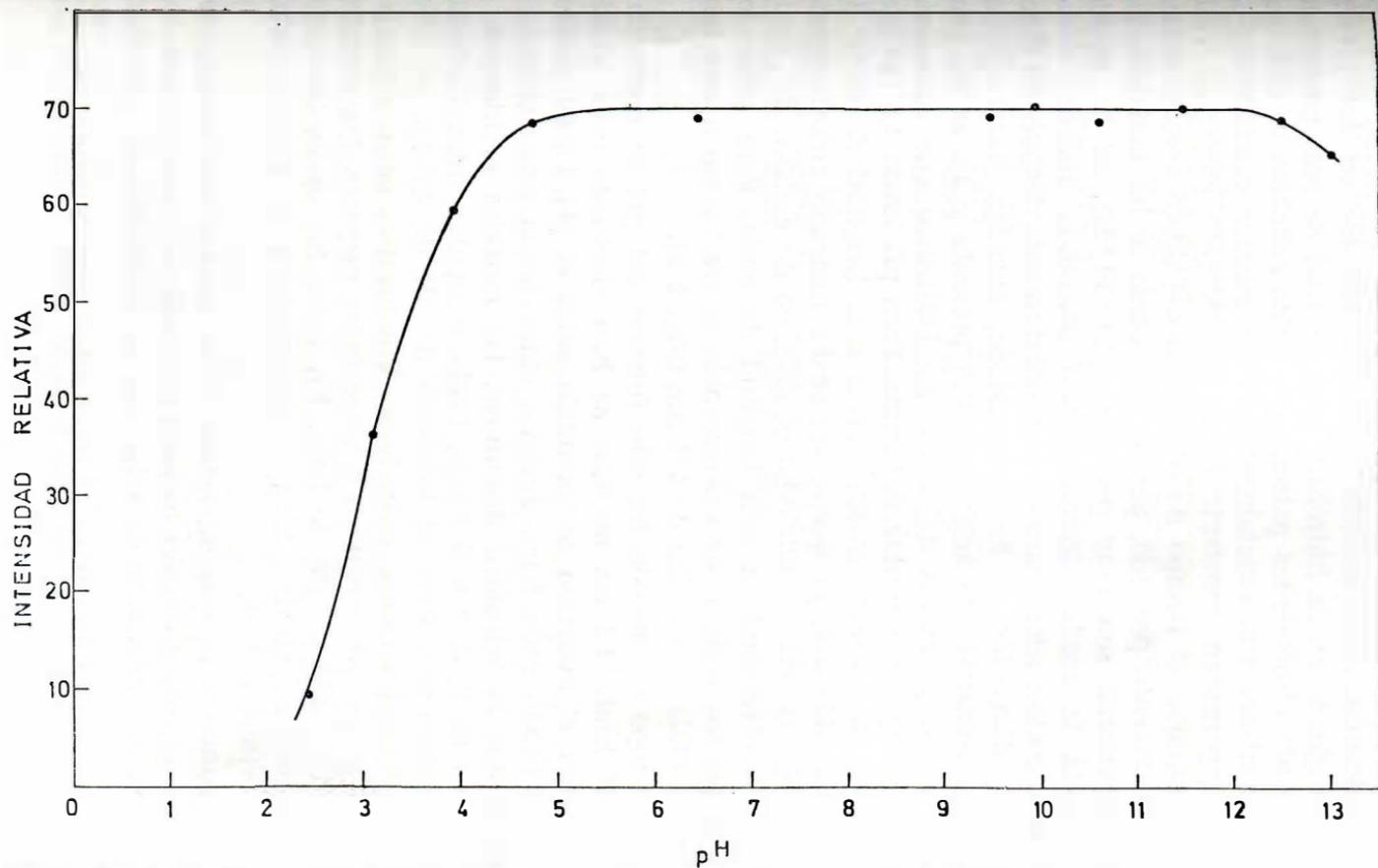


Fig. 2.—Variación de la intensidad relativa de fluorescencia del ácido salicílico en función del pH.

toman muestras sucesivamente de cada uno de estos matraces y se determina fluorimétricamente el contenido en ácido salicílico originado en la hidrólisis, para lo cual se han preparado previamente disoluciones patrones de ácido salicílico de diferentes concentraciones, exactamente en las mismas condiciones de pH, que permiten construir la correspondiente curva de calibrado. Aunque el tiempo de disolución del ácido acetilsalicílico es relativamente pequeño, puesto que, como se ha indicado, las concentraciones son muy pequeñas ($2,0 \cdot 10^{-4} M$), se ha tenido en cuenta la posible descomposición originada durante dicho proceso de disolución. Para ello inmediatamente después de efectuada la disolución se ha determinado, también fluorimétricamente el contenido de ácido salicílico presente y así se ha evaluado la concentración del ácido acetilsalicílico que realmente existe al empezar a contar el tiempo. Para pH hasta 1,5 las medidas de fluorescencia se hicieron a una longitud de onda de emisión de 440 nm, ya que, como se ha indicado anteriormente (Fig. 1 b), en estas condiciones el máximo de emisión del ácido salicílico corresponde a esta longitud de onda. Para todos los demás pH las medidas de fluorescencia se efectuaron a una longitud de onda de emisión de 404 nm (Fig. 1 a).

El tiempo de medida ha sido función del pH de operación. Para pH hasta 1,5 las medidas se han efectuado cada media hora. Para el intervalo comprendido entre el pH 1,5-4,0 se empezó midiendo cada hora durante cinco horas consecutivas; a medida que la velocidad disminuye, las medidas se hicieron a intervalos de 2, 3, 4 y 5 horas, hasta computar unas 72 horas aproximadamente. Para el intervalo de pH de 4,5-8,5, se efectuaron determinaciones cada hora. Finalmente, para pH superiores a 9, que corresponden a velocidades mayores, las medidas se hicieron cada cuarto de hora. En todos los casos, los datos encontrados se ajustan bien a una cinética de primer orden (pseudoprimer orden).

Llamando a la concentración inicial de ácido acetilsalicílico a, y x a la concentración hallada de ácido salicílico al cabo del tiempo t, las constantes de velocidad se obtienen de las pendientes de las rectas obtenidas al representar gráficamente $\log \frac{a}{a-x}$ frente a t.

La tabla I contiene los valores de la constante de velocidad para los diferentes pH a las temperaturas de 17°, 30° y 40° C.

TABLA I
CONSTANTES DE VELOCIDAD A DIFERENTES pH
PARA LA HIDROLISIS DE ACIDO ACETILSALICILICO
A LAS TEMPERATURAS DE 17°, 30° y 40° C

17° C		30° C		40° C	
pH	K _{obs.} (días ⁻¹)	pH	K _{obs.} (días ⁻¹)	pH	K _{obs.} (días ⁻¹)
0,28	0,203	0,40	1,75	0,97	1,63
1,04	0,0211	1,33	0,0744	1,54	0,123
2,64	0,0170	2,55	0,0552	2,74	0,151
3,75	0,0528	3,81	0,192	3,68	0,552
4,69	0,0888	4,58	0,312	4,59	1,06
5,61	0,0864	5,80	0,316	5,79	1,01
6,38	0,0864	7,05	0,384	6,97	1,01
6,92	0,0984	8,58	0,456	8,46	1,17
7,52	0,0960	9,49	0,960	11,45	61,9
8,43	0,134	11,60	63,3	12,32	146
9,24	0,242	12,34	132		
11,70	48,0				
12,27	121				

En la figura 3 se representan las constantes de velocidad en función de pH para las tres temperaturas.

Cálculo de las energías de activación

Admitiendo el mecanismo de Edwards (7), citado anteriormente, de que la hidrólisis del ácido acetilsalicílico se puede explicar mediante la consideración de seis reacciones bimoleculares simultáneas —1—, y que para fines prácticos (8), la constante de velocidad observada viene dada por la expresión —2—, en la que figuran las constantes k_1 , k_4 , k_5 y k_6 , hemos calculado, teniendo en cuenta los valores experimentales, los valores de estas constantes en función de la temperatura y partir de ellos las energías de activación de las cuatro reacciones correspondientes. Los valores encontrados se presentan en la tabla II.

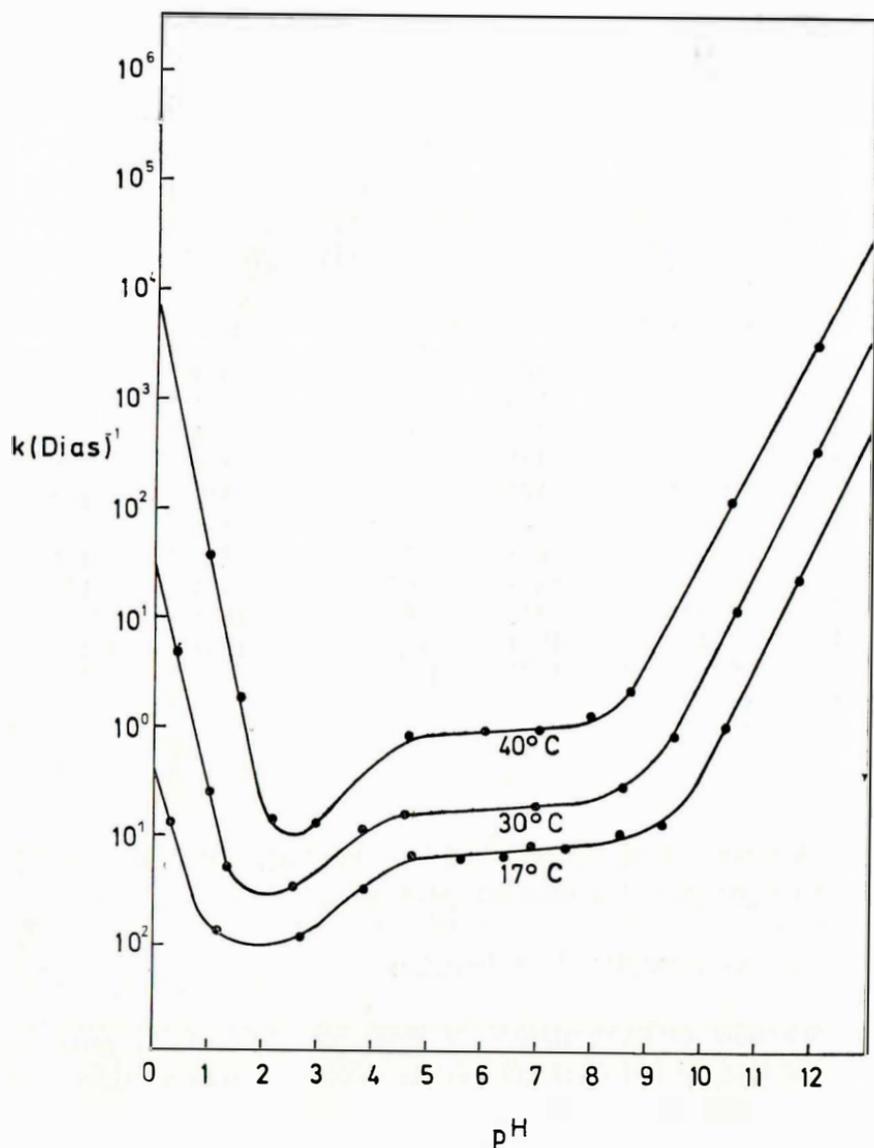


Fig. 3.—Valores encontrados de las constantes de velocidad de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico en función del pH para las temperaturas de 17°, 30° y 40°C.

TABLA II
ENERGIAS DE ACTIVACION DE LAS CUATRO REACCIONES
PRINCIPALES IMPLICADAS EN LA HIDROLISIS DEL ACIDO
ACETILSALICILICO

Reacc.	E (KJ/mol)
1	64,0
2	66,0
5	76,0
6	101,6

DISCUSION

En el presente trabajo se ha puesto a punto una técnica espectrofluorimétrica para seguir la cinética de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico. Con objeto de apreciar la exactitud del método, hemos tomado como referencia los trabajos de Edwards (7) (8), que son indudablemente los más amplios y completos que se han publicado sobre esta hidrólisis, y a los que hacen alusión casi todos los autores que han trabajado sobre este tema posteriormente a Edwards. Para ello se ha procurado trabajar en las mismas condiciones propuestas por el citado autor. Sólo se ha variado el método de análisis para seguir la reacción (Edwards sigue la hidrólisis por espectrofotometría, como se ha dicho) y la concentración inicial de ácido acetilsalicílico que en nuestro caso es notablemente inferior, $2 \cdot 10^{-4}$ M, mientras que Edwards parte de una concentración $3 \cdot 10^{-3}$ M.

Los pH se ajustaron con las mismas disoluciones tampones propuestas por Edwards (7). La fuerza iónica no se mantuvo constante deliberadamente, al igual que hizo Edwards, y estuvo comprendida en la mayoría de los casos entre los valores extremos de 0,1 a 0,3.

La comparación de la curva de 17° C de la figura 3 con la correspondiente que da Edwards (7), muestra que el perfil de la curva es idéntico. Sin embargo, nuestros valores son ligeramente inferiores y el mínimo, en nuestro caso, está desplazado hacia valores de pH también ligeramente más bajos. En todo caso, la concordancia es notable. Esta fue la razón de elegir la temperatura de 17° C, para comparar los resultados con los de Edwards. A temperaturas superiores a 17° C, Edwards (8)

hizo solamente determinaciones puntuales, nosotros hemos estudiado la variación de constante de velocidad en todo el intervalo de pH para las temperaturas de 30° y 40° C.

Edwards (7) afirma que la fuerza iónica no influye significativamente en los valores de la constante de velocidad. Nosotros hemos hecho pruebas obteniendo valores de la citada constante (no publicados aquí) a diferentes fuerzas iónicas extrapolando los resultados a fuerza iónica cero, para pH correspondientes a la región donde la constante de velocidad es prácticamente independiente del pH. Se ha encontrado, que aunque la influencia es efectivamente pequeña, pudiera tener bastante más significación que la que indica Edwards. En este sentido se pretende seguir la investigación.

Las energías de activación calculadas por nosotros (tabla 2), concuerdan también aceptablemente con los valores encontrados por Edwards (8).

BIBLIOGRAFIA

- (1) RATH, J.: *Ann.*, 358, 98 (1908).
- (2) TSAKALOTOS, D. E., and HORSCH, S.: *Bull. Soc. Chem.*, 15, 743 (1914); 17, 401 (1915).
- (3) WOLF, A.: *Sv. Kem. Tidskr.*, 29, 109 (1917).
- (4) MORTON, C.: *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, 6, 492 (1933).
- (5) LA MER, V. K., and GREENSPAN, J.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 1492 (1934).
- (6) STURTEVANT, J. M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, 77 (1942).
- (7) EDWARDS, L. J.: *Trans. Faraday Soc.*, 46, 723 (1950).
- (8) EDWARDS, L. J.: *Trans. Faraday Soc.*, 48, 696 (1952).
- (9) GARRETT, E. R.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 3401 (1957).
- (10) GARRETT, E. R.: *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, 46, 584 (1957).
- (11) OKANO, S., and KOJIMA, S.: *Yakuzaigaku*, 18, 37 (1958).
- (12) BLAUG, S. M., and WESOLOWSKI, J. W.: *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, 48, 691 (1951).
- (13) NOGAMI, H.; AWAZU, S., and NAKAJIMA, N.: *Chem. Pharm. Bull.*, 10, 503 (1962).
- (14) SANTOPADRE, G., and BOLTON, S.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 19, 550 (1967).
- (15) MURTHY, K. S., and RIPPIE, E. G.: *J. Pharm. Sci.*, 56, 1026 (1967).
- (16) KORNBLUM, S. S., and ZOGLIO, M. A.: *Ibid.*, 56, 1569 (1967).
- (17) FERSHT, A. R., and KIRBY, A. J.: *J. Amer. Soc.*, 89, 4852 (1967).
- (18) KELLY, C. A.: *J. Pharm. Sci.*, 59, 1053 (1970).
- (19) FERRONI, E., and BAISTROCCHI, R.: *Sperimentale Sez. Chim. Biol.*, 4, 7 (1953).