

R.9811

T-509



C/. Profesor García González, s/n.  
Teléfono: (95) 455 67 24 - 28  
Fax: (95) 423 37 65  
41012 SEVILLA (ESPAÑA)

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA  
CATEDRA DE FARMACIA GALENICA

**"INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES DE  
FORMULACION SOBRE LA ESTABILIDAD  
DE PREPARADOS FARMACEUTICOS DE  
TIOMERSAL"**

**Memoria presentada por María José Pérez Barrales  
para optar al grado de Licenciatura en Farmacia**

**Sevilla, Octubre de 1993**

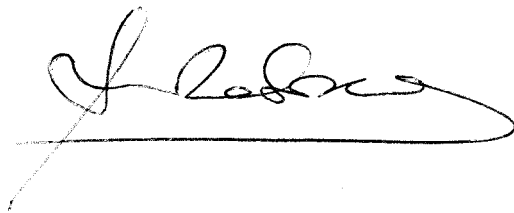
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA**

**Memoria presentada por María José Pérez Barrales  
para optar al Grado de Licenciado en Farmacia**

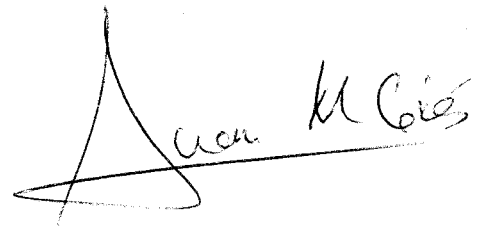


**Fdo.: María José Pérez Barrales**

**V° B° Los directores de la Tesis de Licenciatura**



**Fdo.: Prof. D. Antonio María Rabasco  
Alvarez, Catedrático de Tecnología  
Farmacéutica y Biofarmacia de la  
Universidad de Sevilla**



**Fdo.: Prof. D. Juan Manuel  
Ginés Dorado,  
Ayudante de Farmacia Galénica  
de la Universidad de Sevilla**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

CATEDRA DE FARMACIA GALENICA

C/. Profesor García González, s/n.

Teléfono: (95) 455 67 24 - 28

Fax: (95) 423 37 65

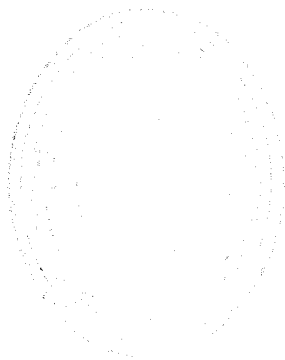
41012 SEVILLA (ESPAÑA)

ANTONIO MARIA RABASCO ALVAREZ, Catedrático de Universidad y JUAN MANUEL GINES DORADO, Ayudante de Universidad, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Sevilla

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis de Licenciatura, titulada "INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES DE FORMULACION SOBRE LA ESTABILIDAD DE PREPARADOS FARMACEUTICOS DE TIOMERSAL", ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. María José Pérez Barrales bajo nuestra dirección, en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y, que hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Sevilla, 27 de Octubre de 1993





UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA  
CATEDRA DE FARMACIA GALENICA

C/. Profesor García González, s/n.  
Teléfono: (95) 455 67 24 - 28  
Fax: (95) 423 37 65  
41012 SEVILLA (ESPAÑA)

ELISA MARHUENDA REQUENA, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la presente Tesis de Licenciatura, elaborada por la Licenciada en Farmacia Dña. María José Pérez Barrales, ha sido dirigida por los Dres. D. Antonio María Rabasco Alvarez y D. Juan Manuel Ginés Dorado, habiéndose realizado en este Departamento cumpliendo con todas las normas vigentes.

Sevilla, 27 de Octubre de 1993



## **AGRADECIMIENTOS**

*Deseo expresar mi agradecimiento a los Dres. D. Juan Manuel Ginés Dorado y D. Antonio María Rabasco Alvarez, por su acertada dirección y ayuda constante, así como por el interés que en todo momento han demostrado hacia este Trabajo.*

*A los licenciados José Ramón Moyano Méndez y M<sup>a</sup> José Arias Blanco por su inestimable ayuda y amistad.*

*A D. Manuel Balón Almeida, D. Jose Antonio Muñoz Sánchez, D. Fernando Iglesias Guerra, D. Jose M<sup>a</sup> Vega Pérez y D<sup>a</sup> Manuela Rueda Rueda por su inestimable asesoramiento y colaboración durante la realización de la presente Memoria.*

*Al resto de los miembros de la Cátedra de Farmacia Galénica y a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de este Trabajo.*

*A Alex sin cuya desinteresada colaboración no se hubiera podido realizar este trabajo.*

*A mis padres, hermanos y demás familiares por el cariño y apoyo que siempre me han dado. Especialmente a mi hermana Rocío por ayudarme y comprenderme (a veces).*

*A mi madrina por demostrarme su comprensión e incondicional aprecio.*

*A todos mis amigos por los buenos y malos ratos que hemos pasado juntos.*

*A mis padres, dos personas  
maravillosas a los que les debo todo*

**INDICE**

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. TIOMERSAL</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1. Aplicaciones en Farmacia</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.2. Estudio descriptivo</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.3. Problemática del uso del tiomersal</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2. ESTABILIDAD</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.1. Cinética química</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.1.1. Definición</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.1.2. Velocidad de reacción</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.1.3. Ecuación de velocidad</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.1.4. Orden de reacción</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.1.5. Constante de velocidad</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2.1.6. Análisis de los datos cinéticos</b> .....	<b>12</b>
1.2.1.6.1. Cinética de orden cero .....	13
1.2.1.6.2. Cinética de orden uno .....	14
1.2.1.6.3. Cinética de orden dos .....	15
1.2.1.6.4. Cinética de orden n .....	17
<b>1.2.1.7. Vida media o período de semireacción</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.1.8. Reacciones complejas</b> .....	<b>18</b>
1.2.1.8.1. Reacciones reversibles .....	19
1.2.1.8.2. Reacciones consecutivas .....	21
1.2.1.8.3. Reacciones paralelas .....	24
<b>1.2.1.9. Mecanismos de reacción</b> .....	<b>28</b>
1.2.1.9.1. Aproximación de la etapa de la velocidad determinante .	28
1.2.1.9.2. Aproximaciones del estado estacionario .....	30
<b>1.2.2. Parámetros que afectan a la estabilidad</b> .....	<b>31</b>
1.2.2.1. Actividad y coeficiente de actividad .....	31
1.2.2.2. Fuerza iónica .....	36
1.2.2.3. Teoría de Debye - Hückel .....	37
<b>1.3. ESTABILIDAD DEL TIOMERSAL</b> .....	<b>40</b>
<b>1.3.1. Estabilidad en distintos medios</b> .....	<b>40</b>
1.3.1.1. Estabilidad en estado sólido .....	40
1.3.1.2. Estabilidad en solución .....	40



1.3.2. Mecanismo de degradación .....	42
1.3.3. Influencia de los factores de la formulación en la estabilidad del tiomersal .....	45
1.3.3.1. Influencia del tipo de isotonzante .....	45
1.3.3.2. Estudio de la capacidad protectora de la trometamina .....	49
1.3.3.3. Influencia del pH .....	50
1.3.3.4. Influencia del material de envase .....	51
1.4. OBJETIVOS .....	54
<b>2. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>57</b>
2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS .....	58
2.2. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES .....	58
2.3. CUANTIFICACION DE TIOMERSAL Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION .....	60
2.4. ESTUDIO MICROBIOLOGICO .....	62
2.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO .....	64
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>65</b>
3.1 VALORACION CROMATOGRAFICA .....	66
3.2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD .....	71
3.2.1. Influencia del tipo de isotonzante .....	71
3.2.2. Influencia de la fuerza iónica .....	78
3.2.2.1. En la estabilidad del tiomersal .....	79
3.2.2.2. En la estabilidad del ácido tiosalicílico .....	82
3.2.2.3. En la estabilidad del ácido ditiosalicílico .....	85
3.3. CINETICAS DE DEGRADACION .....	87
3.3.1. Tiomersal .....	87
3.3.2. Acido tiosalicílico .....	88
3.3.2.1. Cinética de degradación en medio acuoso .....	94
3.3.2.2. Cinética de degradación con cloruro sódico al 0.9 % .....	94
3.3.2.3. Cinética de degradación en presencia de trometamina .....	95
3.3.2.4. Cinética de degradación con cloruro sódico 0.9 % y	

trometamina .....	96
3.3.2.5. Mecanismo de degradación .....	96
3.3.2.6. Cinética de degradación del ácido ditiosalicílico	
en presencia del tiosalicílico .....	97
3.3.2.6.1. En medio acuoso .....	97
3.3.2.6.2. En presencia de cloruro sódico 0.9 % .....	99
3.3.2.6.3. En presencia de trometamina .....	99
3.3.2.6.4. En presencia de cloruro sódico y trometamina .....	99
3.3.3. Cinética de degradación del ácido ditiosalicílico. ....	101
3.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....	104
3.4.1. Confirmación de la actividad microbiana del tiomersal. . .	104
3.4.2. Estudio comparado .....	105
4. CONCLUSIONES .....	110
5. BIBLIOGRAFIA .....	113

"Los problemas más acuciantes en el mantenimiento de las lentes de contacto son su esterilización y la presencia de materiales depositados sobre su superficie anterior, siendo imprescindible su eliminación con objeto de evitar intolerancias y posibles infecciones oculares. La falta de limpieza o asepsia puede ser origen de complicaciones infecciosas conjuntivales de repetición o lesiones epiteliales, paso previo de ulceraciones corneales graves; y, refiriéndonos a la propia lente, una lentilla mal conservada modifica sus parámetros, concretamente una hidrófila altera su morfología en medio seco.

A pesar de que el ojo posee sus propios mecanismos de defensa (lisozima, inmunoglobulinas) y que las lentillas ofrecen una resistencia natural a dejarse penetrar por las bacterias, es necesario su limpieza, desinfección y conservación en condiciones idóneas ya que las lentes se contaminan y a ello contribuye la manipulación de la prótesis, el deterioro de las mismas (estrías, rayaduras) y la acumulación de materiales (depósitos) procedentes de las lágrimas o de las glándulas oculares. Todo esto supone el acantonamiento de los gérmenes que ven en los depósitos un verdadero caldo de cultivo.

No obstante, la gran profusión de métodos y productos de limpieza o de conservación, llevan a la confusión a los propios profesionales; esto unido a la escasa información de algunas soluciones por considerarse fórmulas secretas, los intereses comerciales, su venta en ópticas, etc., conduce a una verdadera vorágine de productos comerciales, que es preciso resolver y resumir aceptando estas soluciones, primero como productos farmacéuticos y segundo restringiendo su divulgación". (**J. JORDANO: "Farmacología ocular" Ponencia oficial LXI congreso de la sociedad española de oftalmología. Pamplona, Septiembre 1985).**

"El desarrollo experimentado en los últimos años por las lentes de contacto ha dado lugar a que el número de usuarios de este tipo de correctores ópticos sea cada vez mayor. Esto, a su vez, ha originado la aparición de preparados para su cuidado y mantenimiento, los cuales pueden presentar un riesgo sanitario debido al uso prolongado y permanente que de ellos se hace, si no poseen la inocuidad y calidad requeridas para su empleo. Con el objeto de proteger la salud ocular de los usuarios de lentes de contacto, se hace necesario regular las condiciones técnicas y sanitarias de los productos para su cuidado y mantenimiento". [**Real Decreto 1082/1991, de 28 de Junio de 1991 (B.O.E. del 13 de Julio)**].

## **INTRODUCCION**

## **1.1. TIOMERSAL**

### **1.1.1. Aplicaciones en Farmacia**

El tiomersal, tradicionalmente, se ha usado como antibacteriano, con leves propiedades bacteriostáticas y fungistáticas, en formulaciones tópicas para la piel, (para la desinfección de la piel antes de una operación, en heridas y abrasiones), en forma de soluciones, tinturas, cremas o aerosoles al 0.1 %. En estas aplicaciones el tiomersal es muy inferior al yodo, los yodóforos y la clorhexidina. Por otra parte, tiene menor efectividad y es menos tóxico que el cloruro de mercurio (1 - 3).

Bajo administración oftálmica, en irrigaciones uretrales y a nivel de la mucosa nasal también se utilizan soluciones acuosas, al 0.001 % y 0.002 %. En forma de pomada o tintura se puede emplear para tratar infecciones micóticas de la piel (3).

El tiomersal puede emplearse al 0.01 % en sangre total, plasma o suero como conservante, sin que se hayan mencionado efectos adversos atribuibles a tales productos hematológicos (1, 3).

También se utiliza al 0.001 % y 0.002 % como conservante de productos biológicos (3). Actualmente se usa como conservante en formas farmacéuticas semisólidas tópicas, inyectables, soluciones oftálmicas, etc. (4).

Por otra parte, el tiomersal es, hoy día, junto al gluconato de clorhexidina el conservante más utilizado en soluciones para lentes de contacto, tanto como conservante en las soluciones de enjuagado y limpieza, al 0.001 %, como en la desinfección química de lentes de contacto blandas al 0.002 % (5 - 7).

### 1.1.2. Estudio descriptivo

Nombres químicos: Sal sódica del etil(2-S-mercaptobenzoato) mercurio (2, 8); sal sódica del [(o-carboxifenil)tio] etil mercurio (1, 2, 8); etilmercuriotiosalicilato sódico (1, 8). Etil (o-mercaptobenzoato sódico) mercurio (8).

Nombres comunes: Tiomersal (B. P.) (9), thimerosal (U. S. P.) (10), mertiolato, tiomersalato, mercurotiolato, mertorgán, merfamín, mertiolato sódico, merzomín (1, 2).

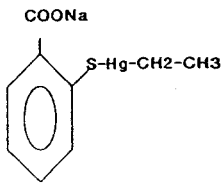
El tiomersal se presenta como polvo blanco cristalino, con olor tenue característico (1, 8). Cristaliza en el sistema ortorrómbico (8).

Se puede obtener tratando una solución etanólica de ácido tiosalicílico con cloruro (o hidróxido) de etil mercurio, en presencia de hidróxido sódico (8).

El tiomersal es incompatible con aluminio, compuestos fenilmercúricos y compuestos de amonio cuaternario en concentración igual o superior al 0.01 % (8). Según otras fuentes, es incompatible con sulfuros y con soluciones de nitrato de plata así como con ácidos, yodo, sales de metales pesados y muchos álcalis. Las soluciones se deben proteger de la luz (1).

En cuanto a su estabilidad, a pesar de su amplia utilización en el campo farmacéutico, existen evidencias de problemas de estabilidad. La velocidad de oxidación del tiomersal en solución se ve enormemente aumentada en presencia de trazas de iones de cobre. En presencia de soluciones de ácidos débiles, precipita como el correspondiente ácido el cual, posteriormente, sufre una lenta descomposición formándose productos insolubles (1).

En la siguiente tabla, se recogen las principales características fisicoquímicas.

Fórmula Química  (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> HgNaO <sub>2</sub> S)	
Peso Molecular (u.m.a.)	404.84
Solubilidad <sup>(1)</sup>	
tiomersal: agua	1:1
tiomersal: alcohol	1:8
tiomersal: éter	insoluble
tiomersal: benceno	insoluble
Densidad aparente (g/cc)	0.33
pK <sub>a</sub>	3.05 <sup>(1)</sup>
	3.143 <sup>(2)</sup>
Punto de fusión (°C)	230

(1): a 25 °C.

(2): a 30 °C y fuerza iónica 0.5 M.

Tabla 1.- Principales características fisicoquímicas del tiomersal.

### 1.1.3. Problemática del uso del tiomersal

En cuanto a sus características microbiológicas, el tiomersal presenta en medio ácido (pH < 5) su mayor actividad (12) y en él, actúa como bactericida (8). No obstante, su acción es óptima en medio neutro o débilmente alcalino (12), en los

cuales actúa como bacteriostático y fungistático, no siendo efectivo contra organismos formadores de esporas (8).

Presenta toxicidad similar a otros compuestos de mercurio, aunque su acción es más selectiva sobre el sistema nervioso central, pudiendo, por ello, causar daño permanente (1).

En unos estudios sobre la influencia de algunas sustancias en el movimiento ciliar, se encontró que el tiomersal detiene este movimiento ciliar entre 40 y 100 minutos (13), sin alterar significativamente las propiedades viscoelásticas del moco ni el aclaramiento nasal (14).

También se han publicado fenómenos de ciliotoxicidad (15) y de ototoxicidad debidos a esta sustancia (16).

A nivel ocular, el análisis de distintas preparaciones oftálmicas indica que la toxicidad de algunas de ellas se puede achacar al tiomersal (17). Así, soluciones desinfectantes de lentes de contacto que contengan peróxido de hidrógeno (0.5 - 3 %) o gluconato de clorhexidina (0.004 %) son capaces de eliminar las formas quísticas de *Acanthamoeba* con un tiempo de contacto suficiente, pero no ocurre lo mismo al utilizar una solución de tiomersal al 0.0025 % (18). Otros efectos tóxicos a nivel ocular cuando se utiliza una concentración de 0.01 % son dermatconjuntivitis alérgica de contacto, queratitis epitelial puntata y engrosamiento corneal irreversible en la perfusión (19).

Por otra parte, se han observado varios casos de envenenamiento, algunos de ellos mortales, como consecuencia de la presencia de una cantidad mil veces superior a la normal de tiomersal, en inyectables i.m. de cloranfenicol (8). Asimismo, se han



descrito reacciones severas locales de hipersensibilidad, al usarse como aditivo en la vacuna de la hepatitis B (Engerix-B) (20). También, en la administración de vacunas para ciertas encefalitis que en su formulación contienen tiomersal como conservante, se han observado efectos secundarios entre los que destacan urticaria y eritema multiforme, concluyéndose que estos efectos adversos pueden ser debidos al tiomersal (21).

Ocasionalmente, se han producido envenenamientos mercuriales por aplicación prolongada de tiomersal en las mucosas orofaríngea y rectal (3), así como reacciones de hipersensibilidad, que cursan usualmente con eritema y erupciones papulares o vesiculares. Por todo ello, se ha de evitar la ingestión del producto así como su inhalación y el contacto con piel, nariz y boca (8).

El tiomersal se ha utilizado como conservante adicionado a muchas preparaciones inmunobiológicas. Las preparaciones bajo estudio, al inyectarse vía intraperitoneal a ratones, en un amplio margen de dosificación, incluyéndose la dosis subtóxica, no inducen aberraciones cromosómicas (22). La  $DL_{50}$  subcutánea, en ratas, es de 98 mg/kg (23).

## 1.2. ESTABILIDAD

Los fármacos, solos o bajo diferentes formas farmacéuticas, pueden conservar o no su integridad durante un período determinado, entendiéndose por tal, el mantenimiento de sus propiedades físicas y químicas, potencia, eficacia e inocuidad.

Numerosos factores afectan a la integridad de los fármacos o de los productos farmacéuticos, pudiendo citar, entre otros: humedad, luz, temperatura, concentración, fenómenos oxidativos, tiempo de almacenamiento, catálisis, excipientes, microorganismos, constitución química de los envases, volatilidad de los componentes, etc. (24 - 26).

Las posibles alteraciones de tipo químico, mucho más numerosas que las biológicas, pueden implicar modificación de la potencia original y, por tanto, cambios en sus pautas de utilización y administración.

Por otra parte, los productos originados en la degradación pueden ser inactivos, mostrar mayor o menor actividad, o incluso poseer otros efectos farmacológicos, dando lugar a respuestas inesperadas o a la aparición de reacciones indeseables.

Por todo ello, el producto debe mantener sus características esenciales durante el tiempo que se determine. El establecimiento de este intervalo se realiza mediante la aplicación de distintos principios fisicoquímicos y el estudio analítico del principio activo contenido en las distintas formas farmacéuticas (24).

La integridad de un producto almacenado a temperatura ambiente debe

mantenerse durante un determinado período de tiempo, conocido como fecha de vencimiento del producto. Se considera que una degradación del 10 % del título inicial del fármaco es un límite razonable para que no se modifique sustancialmente su integridad. Si se produce una pérdida superior al 10 %, el medicamento no se acepta y se considera caducado terapéuticamente (25).

### **1.2.1. Cinética química**

Como es bien conocido, el hecho de que una sustancia se degrade implica la existencia de una o más reacciones químicas cuya velocidad determina el tiempo de vida de dicha sustancia.

De este modo, los datos experimentales correspondientes a la degradación de un fármaco son muy importantes en la determinación del mecanismo o mecanismos por los que ocurre esta descomposición y, por tanto, para poder establecer las condiciones de máxima estabilidad en una formulación determinada (27).

#### **1.2.1.1. Definición**

La cinética, no es más que el estudio de las reacciones químicas desde el punto de vista dinámico; mediante su estudio, se pretende determinar la velocidad y el mecanismo de una determinada reacción (28).

Se puede entender como mecanismo el conjunto de todos los procesos elementales o etapas que se producen a la vez y que dan lugar a la reacción global; en definitiva, el mecanismo no es más que un modelo ideal mental para explicar los hechos experimentales.

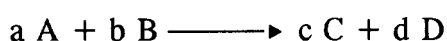
Una reacción puede transcurrir a través de una sola etapa o bien por medio de mecanismos complicados.

Cuando tiene lugar una reacción química, entre las moléculas que intervienen en el proceso se producen colisiones con energía suficiente. Así, definiremos el concepto de molecularidad de un proceso como el número de moléculas o bien de átomos que intervienen en un proceso elemental o etapa (29). Por tanto, siempre será un número entero. Este término se aplicará al mecanismo teórico del proceso de degradación.

El concepto de molecularidad sólo puede aplicarse con propiedad a las reacciones aisladas, ya que si una reacción transcurre a través de varias etapas, no es adecuado hablar de molecularidad del proceso, dado que el número de moléculas o átomos reaccionantes puede no ser el mismo en todos los pasos.

#### 1.2.1.2. Velocidad de reacción

Dada una reacción general del tipo:



en la cual las concentraciones de las especies participantes son  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$  y  $[D]$  en un instante cualquiera (30).

Definimos la velocidad de dicha reacción como la variación de la concentración de reactivos y productos en la unidad de tiempo.

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt} \quad [1]$$

Así, la velocidad de reacción equivale a la derivada de la concentración respecto al tiempo, dividida por un coeficiente estequiométrico apropiado y convertida a un número positivo (31).

### 1.2.1.3. Ecuación de velocidad

Es una ecuación que liga la velocidad de reacción con las concentraciones de reactivos y de productos.

$$v = f ([A], [B], [C], [D] \dots) \quad [2]$$

En algunas reacciones las velocidades son proporcionales a las concentraciones de los reactivos elevadas a una potencia sencilla; sólo en esos casos se puede hablar de orden de reacción.

En general, la ecuación de velocidad se puede expresar por:

$$v = k c_A^\alpha c_B^\beta c_C^\gamma \quad [3]$$

donde  $n$  es el orden de la reacción.

$$n = \alpha + \beta + \gamma \quad [4]$$

#### 1.2.1.4. Orden de reacción

Es la suma de cada uno de los exponentes que aparecen en la ecuación de velocidad. El orden puede ser entero o fraccionario y se calcula experimentalmente puesto que no depende de los coeficientes estequiométricos, viniendo determinado por el exponente de la concentración que mejor correlacione los datos experimentales (27).

Algunos autores (32) distinguen entre orden de reacción particular, respecto de cada reactivo, y orden total de reacción. Así, por ejemplo, si la velocidad de una reacción entre dos productos  $A$  y  $B$  es proporcional a la concentración de  $A$  elevada al cuadrado y a la concentración de  $B$ , esta reacción sería de segundo orden respecto de  $A$  y de primer orden respecto de  $B$ , mientras que el orden total de la reacción sería tres.

#### 1.2.1.5. Constante de velocidad

La constante de velocidad proporciona una medida útil de la velocidad de una reacción química a una temperatura determinada (33) ya que mientras que la velocidad de una reacción, medida en un determinado momento, suele ser proporcional a las concentraciones de reactivos elevadas a alguna potencia, esta constante es independiente de dichas concentraciones (34).

La condición de proporcionalidad entre la velocidad de reacción y la concentración del principio activo puede expresarse, en cada instante, mediante la ecuación diferencial:

$$\frac{-d [C]}{dt} = k c^n \quad [5]$$

siendo  $n$  el orden de reacción.

Esta expresión corresponde a la ecuación cinética diferencial general. La constante de proporcionalidad ( $k$ ) entre la velocidad de reacción en un instante dado y una potencia de la concentración del principio activo, es conocida con el nombre de constante de velocidad o velocidad específica.

Las unidades de la constante de velocidad dependen del orden de reacción. En general, para una reacción de  $n$ -ésimo orden, las unidades de dicha constante son  $c^{1-n} t^{-1}$ .

#### 1.2.1.6. Análisis de los datos cinéticos

Mediante este análisis, se pretende ver cómo varía la velocidad con la concentración de los reactivos y otras sustancias.

Básicamente, podría afirmarse que existen dos métodos de análisis: el método de integración o integral y el método diferencial. Estudiaremos únicamente el método integral pues es el que más se ajusta a nuestras necesidades.

Dicho método se caracteriza porque parte de una ecuación cinética que *a priori* supone correcta.

Existen distintos tipos de cinética que explicaremos a continuación.

### 1.2.1.6.1. Cinética de orden cero

Son aquellas en las que la velocidad de degradación es independiente de la concentración de los reactivos. Esto ocurre debido a la existencia de un factor limitante, como puede ser la solubilidad, la difusión, la acción de la luz, etc.

Considerando el caso más sencillo en el cual un reactivo  $A$  se transforma dando un producto  $P$ :



Suponiendo que sigue una cinética de orden cero, la ecuación diferencial sería (35):

$$\frac{-d[A]}{dt} = k [A]^0 = k \quad [6]$$

donde:

$-d[A]/dt$  es la velocidad instantánea de la reacción

$k$  es la constante de velocidad de reacción

$A$  es la concentración del reactivo en un tiempo  $t$

Separando variables e integrando la ecuación entre los límites  $A_0$ , que es la concentración en el tiempo inicial,  $t = 0$  y  $A$  que será la concentración a tiempo  $t$ , tenemos:

$$-\int d[A] = \int k dt \quad [7]$$



La ecuación de velocidad integrada es la siguiente:

$$[A] = [A]_0 - k t \quad [8]$$

que es la ecuación de una recta con pendiente  $-K_0$  (24).

#### 1.2.1.6.2. Cinética de orden uno

Una reacción se dice que es de primer orden cuando su velocidad es proporcional a la concentración de una de las sustancias reaccionantes. En este tipo de reacción, el reactivo se puede convertir en uno o más productos; sin embargo, al igual que en el caso anterior, consideremos el ejemplo más simple :



Su ecuación diferencial sería (36):

$$\frac{-d [A]}{dt} = k [A] \quad [9]$$

Integrando la ecuación anterior:

$$-\int \frac{d [A]}{[A]} = \int k dt \quad [10]$$

Finalmente obtenemos:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k[A] \quad [11]$$

siendo:

$A_0$ : concentración inicial en el tiempo  $t = 0$

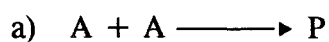
A: concentración en el tiempo  $t$

k: constante de velocidad de reacción de primer orden.

Al representar  $\ln A$  versus  $t$  se obtendrá una línea recta, cuya pendiente será  $-k$ .

#### 1.2.1.6.3. Cinética de orden dos

Cuando la velocidad de una reacción depende de la concentración de dos sustancias reaccionantes, o bien de la concentración de un solo reactivo, elevada al cuadrado (37), la reacción se denomina de segundo orden. Se pueden presentar los siguientes casos:



En el primero de los casos:

$$\frac{-d [A]}{dt} = k [A]^2 \quad [12]$$

Integrando:

$$-\int \frac{d [A]}{[A]^2} = \int k dt \quad [13]$$

Finalmente, se obtiene (38):

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k t \quad [14]$$

siendo:

$A_0$ : concentración inicial

A: concentración en el tiempo t.

Tal como se deduce de esta ecuación, al representar  $1/A$  frente a t se originará una línea recta de pendiente  $k$  (39).

En el segundo de los casos, la integración de la ecuación diferencial proporciona otra expresión bastante más compleja. Así, la ecuación final es la siguiente:

$$k t = \left( \frac{1}{B_0 - A_0} \right) \text{Ln} \left( \frac{A_0 B_t}{B_0 A_t} \right) \quad [15]$$

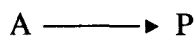
siendo:

$A_0$  y  $B_0$ : concentraciones iniciales de las sustancias A y B, respectivamente (39)

A y B: concentraciones en el tiempo t.

#### 1.2.1.6.4. Cinética de orden n

Consideremos ahora el supuesto de que una reacción tenga un orden de reacción "n":



$$\frac{-d[A]}{dt} = k [A]^n \quad [16]$$

Integrando:

$$-\int \frac{d[A]}{[A]^n} = \int k dt \quad [17]$$

Finalmente, se obtiene la ecuación:

$$k t = \frac{1}{n - 1} \left( \frac{1}{[A]^{n-1}} - \frac{1}{[A]_0^{n-1}} \right) \quad [18]$$

Para  $n \geq 2$  se utiliza esta fórmula general.

#### 1.2.1.7. Vida media o período de semireacción

Representa el tiempo que tarda la concentración inicial de un reactivo en pasar a la mitad. Se representa por  $t_{1/2}$  o  $T$ . El tiempo de vida media depende de la concentración inicial de la sustancia de una forma característica que depende, a su vez, del orden de la reacción y por ello su medida es una guía indicativa del orden de reacción (40). Se calcula sustituyendo en las ecuaciones de cinética anteriormente expuestas la concentración final de la sustancia por el valor que corresponde a la mitad de la concentración inicial.

Se podría obtener  $k$  y  $n$  a partir de la vida media y de las concentraciones iniciales. Pero es un método semicuantitativo no muy preciso.

#### 1.2.1.8. Reacciones complejas

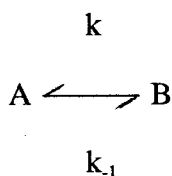
Hemos estudiado las reacciones simples, pero con frecuencia se presentan complicaciones debido a la concurrencia de otros procesos teniendo en general ecuaciones del tipo:

$$v = k [A]^{\alpha} [B]^{\beta} [C]^{\gamma} \quad [19]$$

donde queremos hallar los coeficientes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Dentro de las reacciones complejas distinguimos varios tipos de reacciones:

#### 1.2.1.8.1. Reacciones reversibles



Consideramos inicialmente el caso más sencillo: aquel en que ambas reacciones que se oponen sean de primer orden (41, 42).

Al comienzo del experimento,  $A_0$  será la concentración molar de  $A$ ,  $x$  la fracción molar de  $A$  descompuesta en un tiempo  $t$  y suponiendo que  $B_0 = 0$ , las concentraciones de  $A$  y  $B$  después del tiempo  $t$  son  $(A_0 - x)$  y  $x$ , respectivamente, de manera que la velocidad de formación del compuesto  $B$  en un instante dado vale:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 (A_0 - x) - K_{-1} x \quad [20]$$

donde:

$k_1$ : constante de velocidad de la reacción de formación de  $B$

$k_{-1}$ : constante de velocidad para la formación de  $A$

$x$ : cantidad de  $B$  formada o de  $A$  descompuesta.

Cuando el sistema alcanza el equilibrio, las velocidades son iguales ( $dx / dt = 0$ ), y por tanto:

$$k_1 (A_0 - x_e) = k_{-1} x_e \quad [21]$$

siendo  $x_e$  la cantidad formada de B o bien la cantidad descompuesta de A en el equilibrio.

Despejando  $k_{-1}$  y sustituyéndola en la ecuación [20], se obtiene:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \frac{A_0}{x_e} (x_e - x) \quad [22]$$

Integrando, tenemos finalmente:

$$k_1 t = \frac{x_e}{A_0} \operatorname{Ln} \left( \frac{x_e}{x_e - x} \right) \quad [23]$$

Si  $A_t$  es la concentración del reactivo en un tiempo  $t$  y  $A_e$  la concentración del mismo en el equilibrio, entonces:

$$x = A_0 - A_t \quad [24]$$

$$x_e = A_0 - A_e \quad [25]$$

y la ecuación anterior se puede escribir de la forma:

$$k_1 t = (A_0 - \frac{A_e}{A_0}) \text{Ln} \left[ \frac{(A_0 - A_e)}{(A_t - A_e)} \right] \quad [26]$$

la cual permite cuantificar la constante de velocidad de la reacción directa, conocido  $A_0$ ,  $A_t$  y  $A_e$ .

Análogamente, se pueden calcular las ecuaciones correspondientes a procesos reversibles en los que se oponen dos reacciones de orden distinto.

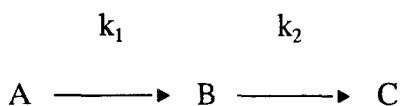
Según la ley de Guldberg y Waage, la constante de equilibrio es igual a la relación de constantes de velocidad directa e inversa:

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad [27]$$

De este modo pueden calcularse  $k_1$  y  $k_{-1}$  separadamente, si se conoce la constante de equilibrio  $K$ .

#### 1.2.1.8.2. Reacciones consecutivas

Este tipo de reacciones se caracterizan porque un reactivo se transforma en un producto a través de un producto intermedio. La cinética que siga cada una de las sustancias no tiene por qué ser la misma.





El ejemplo más simple es aquel en que dos reacciones consecutivas son de orden 1 y monomoleculares (43, 44).

Las velocidades con que varían las concentraciones de  $A$ ,  $B$  y  $C$  son (43 - 45):

$$\frac{-d [A]}{dt} = k_1 [A] \quad [28]$$

$$\frac{d [B]}{dt} = k_1 [A] - k_2 [B] \quad [29]$$

$$\frac{d [C]}{dt} = k_2 [B] \quad [30]$$

Por otra parte, siendo  $A_0$  la concentración inicial de  $A$  podemos decir que en cualquier instante (43):

$$[A]_0 = [A] + [B] + [C] \quad [31]$$

Al integrar la ecuación [28] obtenemos la ecuación:

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad [32]$$

Sustituyendo en la ecuación [29] el valor calculado para  $A$ :

$$\frac{d [B]}{dt} = k_1 [A]_0 e^{-k_1 t} - k_2 [B] \quad [33]$$

Integrando, se obtiene:

$$[B] = [A]_0 \left[ \frac{k_1}{k_2 - k_1} \right] [e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}] \quad [34]$$

Para calcular el valor del producto resultante de la reacción:

$$[C] = [A]_0 - [A] - [B] \quad [35]$$

Sustituyendo los valores de  $A$  y  $B$  en la ecuación [35] obtendremos:

$$[C] = [A]_0 \left( 1 - \frac{k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}}{k_2 - k_1} \right) \quad [36]$$

En el estudio del paso determinante de la velocidad en este tipo de reacciones, pueden considerarse dos casos:

a) La constante de velocidad de la segunda reacción es mucho mayor que la de la primera reacción; es decir, la primera etapa es considerablemente más lenta que

la segunda. En este caso, es la etapa lenta la que controla cinéticamente el proceso

$$(46): k_2 \gg k_1$$

Los valores de  $B$  y  $C$  quedan recogidos en las ecuaciones [37] y [38].

$$[B] = [A]_0 \frac{k_1}{k_2} e^{-k_1 t} \quad [37]$$

$$[C] \approx [A]_0 (1 - e^{-k_1 t}) \quad [38]$$

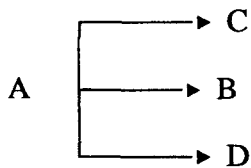
Queda demostrado con la ecuación [38] que la velocidad de formación del producto  $C$  sólo está controlado por  $k_1$ .

b) La segunda etapa es considerablemente más lenta que la primera siendo, por tanto,  $k_2 \ll k_1$

$$[C] \approx [A]_0 (1 - e^{-k_2 t}) \quad [39]$$

### 1.2.1.8.3. Reacciones paralelas

Frecuentemente, una sustancia puede reaccionar de modo que origina diversos productos. El caso más simple es el de 2 reacciones paralelas de primer orden:



La ecuación cinética es la siguiente:

$$\frac{-d [A]}{dt} = k_1 [A] + k_2 [A] + k_3 [A] = (k_1 + k_2 + k_3) [A] \quad [40]$$

Al integrar la ecuación [40] y siendo  $A_0$  la concentración inicial de  $A$  y  $x$  la cantidad descompuesta de  $A$  después del tiempo  $t$ , se obtiene (47):

$$k_1 + k_2 + k_3 = \frac{1}{t} \text{Ln} \left( \frac{A_0}{A_0 - x} \right) \quad [41]$$

Como puede observarse, el proceso total se comporta como si fuera una reacción sencilla de primer orden, donde el valor de la constante de velocidad sería el sumatorio de las constantes de las reacciones simultáneas (47):

$$k_1 + k_2 + k_3 = K \quad [42]$$

Por otra parte,

$$\frac{-d [A]}{dt} = K [A] \quad [43]$$

Integrando la ecuación [43]:

$$[A] = [A]_0 e^{-K t} \quad [44]$$

$$\frac{d [B]}{dt} = k_2 [A] = k_2 [A]_0 e^{-K t} \quad [45]$$

Resolviendo la ecuación [45] en el caso que haya una concentración inicial de la sustancia  $B$  a la que llamaremos  $B_0$ :

$$[B] = [B]_0 + [A]_0 \frac{k_1}{K} (1 - e^{-K t}) \quad [46]$$

También pueden desarrollarse ecuaciones similares a la ecuación [46] cuando exista una concentración inicial, tanto de  $C$  (la cual se nombrará como  $C_0$ ) como de  $D$  (que le asignaremos la nomenclatura de  $D_0$ ).

$$[C] = [C]_0 + [A]_0 \frac{k_2}{K} (1 - e^{-K t}) \quad [47]$$

$$[D] = [D]_0 + [A]_0 \frac{k_3}{K} (1 - e^{-Kt}) \quad [48]$$

Si se supone que, inicialmente, no existen concentraciones de *B*, *C*, y *D*:

$$[B]_0 = [C]_0 = [D]_0 = 0 \quad [49]$$

Entonces:

$$[B] : [C] : [D] = k_1 : k_2 : k_3 \quad [50]$$

De estas ecuaciones se deduce que, en cualquier momento, los productos están en una relación constante independiente del tiempo y de la concentración inicial de *A*. Basándose en ello, se pueden conocer las constantes por separado determinando dichas concentraciones en cualquier momento, por ejemplo, al final del período de estudio.

Además, la existencia de esta relación constante entre las concentraciones de los productos, permite distinguir las reacciones paralelas de las consecutivas aunque ello sólo es posible si las reacciones paralelas son del mismo orden.

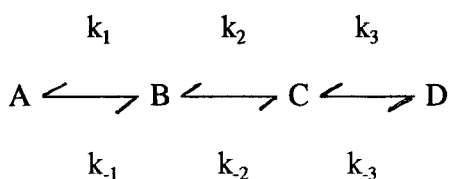
### 1.2.1.9. Mecanismos de reacción

Las ecuaciones cinéticas, anteriormente descritas, suministran información sobre el mecanismo de la reacción, en el sentido de que cualquier mecanismo propuesto debe cumplir la ecuación cinética observada. Generalmente, no es posible una deducción exacta de la ecuación cinética a partir de las ecuaciones diferenciales de un mecanismo de varias etapas, a causa de las dificultades matemáticas para tratar un sistema de varias ecuaciones diferenciales interrelacionadas. Por tanto, suele usarse uno de los dos métodos siguientes: la aproximación de la etapa de la velocidad determinante o la del estado estacionario.

#### 1.2.1.9.1. Aproximación de la etapa de la velocidad determinante

Con el siguiente método (también llamado aproximación de la etapa limitante o aproximación de equilibrio), el mecanismo de la reacción se supone que consta de una o más reacciones reversibles que permanecen cercanas al equilibrio durante la mayor parte de la reacción, seguidas por una etapa limitante relativamente lenta, la cual, a su vez, es seguida por una o más reacciones rápidas. En casos especiales, pueden que no existan etapas de equilibrio antes de la etapa limitante o reacciones rápidas después de la misma.

Como un ejemplo, consideremos el siguiente mecanismo, compuesto de reacciones (elementales) unimoleculares:



donde se supone que la etapa 2, es decir, el paso de  $B$  a  $C$  es la limitante. Para que esta suposición sea válida, deberá cumplirse que  $k_{-1} \gg k_2$ . La velocidad lenta de formación de  $C$  a partir de  $B$ , comparada con la velocidad de formación de  $A$  a partir de  $B$ , asegura que la mayoría de las moléculas de  $B$  se reconvierten en  $A$  antes de dar  $C$ , asegurando que la etapa 1 permanece cercana al equilibrio. Además de esto, deberá cumplirse que  $k_3 \gg k_2$  y  $k_3 \gg k_{-2}$ , para asegurar que la etapa 2 actúa como "cuello de botella" y que el producto  $D$  se forma rápidamente a partir de  $C$ . La reacción global viene, entonces, controlada por la etapa limitante de formación de  $C$  a partir de  $B$ . (Nótese además que  $k_3 \gg k_{-2}$ , la etapa limitante no está en equilibrio).

Puesto que estamos examinando la velocidad de la reacción directa  $A \rightarrow D$ , suponemos además que  $k_2 [B] \gg k_{-2} [C]$ . Durante los primeros momentos de la reacción, la concentración de  $C$  será baja comparada con la de  $B$ , cumpliéndose la condición anterior. Así, despreciamos la reacción inversa en la etapa 2.

Puesto que la etapa que controla la velocidad se ha considerado esencialmente irreversible, es irrelevante que las etapas rápidas después de la limitante sean reversibles o no. La ecuación cinética observada dependerá sólo de la naturaleza del equilibrio que precede la etapa limitante y de esta propia etapa.

La magnitud relativa de  $k_1$ , comparada con  $k_2$ , es irrelevante para la validez de la aproximación de la etapa de la velocidad limitante. Por tanto, la constante de velocidad  $k_2$  de la etapa limitante podría ser mayor que  $k_1$ . Sin embargo, la velocidad  $v_2 = k_2 [B]$  de la etapa limitante debe ser mucho más pequeña que la velocidad  $v_1 = k_1 [A]$  de la primera etapa. Esto se deduce a partir de que  $k_2 \ll k_{-1}$  y además que el cociente  $k_1 / k_{-1}$  es aproximadamente igual al cociente  $[B] / [A]$ .



Para la reacción global inversa, la etapa limitante es la inversa de la reacción directa. Por ejemplo, para la ecuación inversa de la reacción global descrita anteriormente, la etapa limitante es la formación de  $C$  a partir de  $B$ . Esto se desprende de la desigualdad anterior  $k_2 \ll k_3$  (que establece que la etapa de formación de  $D$  a partir de  $C$  está en equilibrio) y  $k_1 \gg k_2$  (que indica que la formación de  $A$  a partir de  $B$  es rápida) (48).

#### 1.2.1.9.2. Aproximaciones del estado estacionario

Los mecanismos de reacción de varias etapas generalmente presentan una o más especies intermedias, que no aparecen en las ecuaciones globales. Frecuentemente, estos intermedios son muy reactivos y, por consiguiente, no se acumulan en grado sustancial durante el transcurso de la reacción; es decir, que la concentración de intermedio es mucho menor que la de reactivo y de producto durante la mayor parte de la reacción, donde  $I$  es un intermedio y  $R$  y  $P$  son reactivos y productos. Son muy raras las oscilaciones en la concentración de una especie durante una reacción, por lo que supondremos que la concentración de  $I$  comenzará en 0, alcanzará un máximo  $I_{m\acute{a}x}$ , y después volverá a 0. Si la concentración de  $I$  permanece pequeña durante la reacción,  $I_{m\acute{a}x}$  será pequeña comparada con  $R_{m\acute{a}x}$  y  $P_{m\acute{a}x}$ . Así, se cumple que:

$$\frac{d [I]}{dt} \ll \frac{d [R]}{dt} \quad [51]$$

$$\frac{d [I]}{dt} \ll \frac{d [P]}{dt} \quad [52]$$

Por tanto, es con frecuencia una buena aproximación tomar el cociente  $d[I] / dt = 0$  para cada intermedio reactivo. Esta es la aproximación del estado estacionario. Esta aproximación supone que, después del período de inducción, la velocidad de formación de un intermedio de reacción coincide esencialmente con su velocidad de desaparición, consiguiéndose así que éste se mantenga en una concentración próxima a un valor constante (49).

La aproximación del estado estacionario generalmente da ecuaciones cinéticas más complicadas que las de la aproximación de la etapa limitante. En una reacción dada, una, ambas o ninguna de estas aproximaciones pueden ser válidas.

Se han desarrollado programas de cálculo con el objeto de integrar numéricamente las ecuaciones diferenciales de un mecanismo de varias etapas sin ninguna aproximación. Dichos programas han mostrado que la aproximación del estado estacionario, ampliamente usada, puede a veces conducir a errores sustanciales.

## 1.2.2. **Parámetros que afectan a la estabilidad**

### 1.2.2.1. **Actividad y coeficiente de actividad**

Las disoluciones de electrolitos han de ser tratadas de forma diferente a las soluciones de no electrolitos puesto que las primeras sufren una disociación, pero los iones no se pueden estudiar independientemente ya que se aplica la condición de neutralidad eléctrica (50).

Considerando la solución de un electrolito disociado totalmente en iones, la

energía libre de la solución será la suma de las energías libres del solvente y de los iones negativos y positivos (51).

$$G = n_s \mu_s + n_+ \mu_+ + n_- \mu_- \quad [53]$$

Si cada mol de electrolito se disocia en iones positivos  $\nu_+$  e iones negativos  $\nu_-$ , entonces  $n_+ = \nu_+ n$  y  $n_- = \nu_- n$  en donde  $n$  es el número de moles de electrolito en la solución. La ecuación [53] se transforma en:

$$G = n_s \mu_s + n (\nu_+ \mu_+ + \nu_- \mu_-) \quad [54]$$

Si  $\mu$  es el potencial químico del electrolito en la solución, tendremos:

$$G = n_s \mu_s + n \mu \quad [55]$$

Comparando las ecuaciones [54] y [55], vemos que:

$$\mu = \nu_+ \mu_+ + \nu_- \mu_- \quad [56]$$

Supongamos que el total de moles de iones producido por un mol de electrolito sea  $\nu = \nu_+ + \nu_-$ . Entonces el potencial químico medio  $\mu_{\pm}$  está definido por:

$$v \mu_{\pm} = v_{+} \mu_{+} + v_{-} \mu_{-} \quad [57]$$

Definiendo de un modo puramente formal las distintas actividades (52):

$$\mu = \mu^0 + R T \text{Ln } a \quad [58]$$

$$\mu_{\pm} = \mu_{\pm}^0 + R T \text{Ln } a_{\pm} \quad [59]$$

$$\mu_{+} = \mu_{+}^0 + R T \text{Ln } a_{+} \quad [60]$$

$$\mu_{-} = \mu_{-}^0 + R T \text{Ln } a_{-} \quad [61]$$

donde:

$a$  es la actividad del electrolito

$a_{\pm}$  es la actividad iónica media

$a_{+}$  y  $a_{-}$  son las actividades individuales iónicas.

Para definir completamente las distintas actividades requerimos las siguientes ecuaciones:

$$\mu^0 = \nu_+ \mu_+^0 + \nu_- \mu_-^0 \quad [62]$$

$$\nu \mu_{\pm}^0 = \nu_+ \mu_+^0 + \nu_- \mu_-^0 \quad [63]$$

Según las ecuaciones [56] y [57] tenemos que  $\mu = \nu \mu_{\pm}$ . Empleando los valores para  $\mu$  y  $\mu_{\pm}$  según las ecuaciones [58] y [59]:

$$\mu^0 + R T \text{Ln } a = \nu \mu_{\pm}^0 + \nu R T \text{Ln } a_{\pm} \quad [64]$$

Esto se reduce a:

$$a = a_{\pm}^{\nu} \quad [65]$$

La relación entre  $a_{\pm}$ ,  $a_+$  y  $a_-$ , aplicando los valores de  $\mu_{\pm}$ ,  $\mu_+$  y  $\mu_-$ , es:

$$a_{\pm}^{\nu} = a_+^{\nu_+} a_-^{\nu_-} \quad [66]$$

La actividad iónica media, es la media geométrica de las actividades iónicas individuales.

Por otra parte, tenemos que los distintos coeficientes de actividad están definidos por las relaciones:

$$a = \gamma m \quad [67]$$

$$a_{\pm} = \gamma_{\pm} m_{\pm} \quad [68]$$

$$a_{+} = \gamma_{+} m_{+} \quad [69]$$

$$a_{-} = \gamma_{-} m_{-} \quad [70]$$

donde  $\gamma_{\pm}$  es el coeficiente de actividad iónica media,  $m_{\pm}$  es la molalidad iónica media, etc.

El coeficiente de actividad iónica media mide el grado de divergencia del comportamiento de una sustancia con respecto al comportamiento ideal o idealmente diluido (53).

Relacionando las ecuaciones [58] y [65] (53):

$$\mu = \mu^0 + R T \text{Ln } a_{\pm}^{\nu} \quad [71]$$

### 1.2.2.2. Fuerza iónica

La evaluación de los coeficientes de actividad de muchos sistemas, condujo a Lewis y Randall a reconocer que el coeficiente de actividad media de los iones de un electrolito está relacionado como una función de la concentración de especies con cargas existentes en la disolución. El que exista esta relación es reflejo del hecho de que son, ante todo, las interacciones iónicas las principales responsables de la no idealización de los solutos iónicos. Lewis y Randall introducen el concepto de "fuerza iónica" como una medida de la no idealidad de que la disolución impone a cualquier electrolito disociado en la disolución (54).

La fuerza iónica  $I$ , es una característica de la disolución y se define como:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad [72]$$

siendo:

$m_i$ : molalidad de cada una de las especies cargadas en la disolución (individualmente)

$z_i$ : cargas de cada ión.

También podemos expresar la fuerza iónica como:

$$I = \frac{1}{2} \frac{1}{\rho_0} \sum_i c_i z_i^2 \quad [73]$$

siendo:

$c_i$ : concentración de cada una de las especies

$\rho_0$  : densidad del disolvente puro.

La fuerza iónica del medio afecta a las reacciones de electrolitos, pudiendo variar algunos factores como por ejemplo la velocidad de reacción. Así, Brønsted, Bjerrum y otros demostraron que la velocidad de una reacción iónica depende de la fuerza iónica de la disolución (55). También la fuerza iónica puede afectar a la solubilidad de algunas sustancias en un ámbito determinado de pH (56) mientras que en otros casos, los mejores resultados de disolución se obtienen con unos valores mayores de fuerza iónica, variando los resultados según el anión presente (57). En otras ocasiones se puede ver afectada su estabilidad (58, 59).

### 1.2.2.3. Teoría de Debye - Hückel

Para describir el comportamiento de un electrolito en una solución diluida, el potencial químico debe escribirse en la forma:

$$\mu = \mu^0 + \nu R T \ln m + \nu R T \ln \gamma_{\pm} \quad [74]$$

$\mu^0$  es independiente de la composición, mientras que los términos 2º y 3º dependen de ella.

La energía libre extra, representada por el término  $\nu R T \ln \gamma_{\pm}$  de la ecuación [74], corresponde principalmente a la energía de interacción de las cargas eléctricas en los iones (60).



Las fuerzas de Van der Waals que actúan entre las partículas neutras del solvente y el no electrolito son débiles y efectivas sólo a distancias muy pequeñas, mientras que las de Coulomb que actúan entre iones y entre iones y moléculas neutras del solvente, son mucho más fuertes y se hacen sentir a distancias mayores (61).

Esta diferencia en el margen de acción explica las acentuadas desviaciones respecto del comportamiento ideal en las soluciones iónicas, incluso a diluciones altas donde los iones están bastante separados (62).

La contribución eléctrica a la energía libre es la ley límite de Debye - Hückel que se expresa:

$$\log_{10} \gamma_{\pm} = \left[ \frac{\sqrt{(2 \pi N_0)}}{2.303} \left( \frac{e^2}{10 \epsilon K T} \right)^{2/3} \right] z_+ z_- \sqrt{I} \quad [75]$$

en donde:

$N_0$ : número de iones

$K$ : constante de Boltzmann

$\epsilon$ : constante dieléctrica

$e$ : magnitud de la carga del electrón

$T$ : temperatura

$z_+ z_-$ : producto de las cargas reaccionantes

$I$ : fuerza iónica.

El factor encerrado entre corchetes está constituido por constantes universales y los valores de  $\epsilon$  y  $T$ . A una temperatura específica,  $\epsilon$  y  $T$  son constantes y la

ecuación puede expresarse como:

$$\log_{10} \gamma_{\pm} = A z_{+} z_{-} \sqrt{I} \quad [76]$$

donde A es la constante de Debye - Hückel (63).

La ley límite de Debye - Hückel predice que el logaritmo del coeficiente de actividad medio debe ser una función lineal de la fuerza iónica y que la pendiente de la curva debe ser proporcional al producto de las valencias de los iones positivos y negativos.

Estas predicciones han sido confirmadas experimentalmente en soluciones diluidas de electrolitos fuertes (64).

Las aproximaciones requeridas por la teoría limitan su validez sólo a soluciones muy diluidas. En la práctica, las desviaciones respecto de la ley límite se hacen notorias en el intervalo de concentración de 0.005 M a 0.01 M (65).

La teoría de Debye - Hückel reconoce la existencia de un efecto estabilizante sobre cada ión en particular, debido al exceso de iones de carga opuesta que tienden a rodear preferentemente al ión y que restringen los movimientos de los iones en el seno de la disolución.

Esta teoría anterior no tiene en cuenta el tamaño de los iones, importante cuando la disolución es más concentrada. Se ha intentado modificar la ecuación [76] para aplicarla en este tipo de soluciones más concentradas, pero los datos obtenidos no corresponden a los calculados experimentalmente (66).

### **1.3. ESTABILIDAD DEL TIOMERSAL**

#### **1.3.1. Estabilidad en distintos medios**

##### **1.3.1.1. Estabilidad en estado sólido**

El tiomersal se descompone entre 205 y 230 °C (8). El polvo es estable en el aire, pero no a la luz solar (2).

##### **1.3.1.2. Estabilidad en solución**

Existen bastantes contradicciones entre las distintas fuentes bibliográficas en este punto.

Según algunas, el tiomersal es compatible en solución con alcoholes y jabones; además, es estable frente al calor y fotolábil (8).

Por otra parte, el cobre y otros metales aumentan fuertemente su velocidad de oxidación, mientras que otros autores afirman que el oxígeno ejerce un efecto negativo sobre la estabilidad del tiomersal en solución (67).

Aunque es fotolábil, es más estable en medio ácido que en medio alcalino, siendo máxima su estabilidad a la luz en el ámbito de pH comprendido entre 5 y 6 unidades. Sin embargo, en soluciones débilmente ácidas, el tiomersal puede precipitar como su ácido correspondiente, el cual a su vez podría experimentar una lenta descomposición con formación de productos insolubles (1, 8). Por todo ello, las

soluciones deben almacenarse en envases que las protejan de la luz y tamponadas a un pH entre 6 y 7 unidades. Además, debe evitarse la presencia de agentes reductores (8).

El AEDT es ampliamente utilizado en los productos existentes en el mercado, como potenciador de la acción antimicrobiana de los conservantes, entre ellos el tiomersal (4, 69). Sin embargo, algunos autores (1) señalan que la actividad antimicrobiana de dichas soluciones se reduce al añadirles AEDT o tiosulfato sódico. Por último, otras fuentes (68) afirman que, dadas las contradicciones existentes, la inclusión de AEDT en las soluciones que contienen tiomersal es cuestionable.

Mientras ciertos autores (8) afirman que el tiomersal es compatible con solución salina isotónica, investigaciones más recientes (70 - 73) sostienen la hipótesis de que el cloruro sódico utilizado como isotonzante ejerce una influencia decisiva en la descomposición del tiomersal.

Así, algunos autores realizaron diversos estudios utilizando otros isotonzantes con el objeto de conseguir una mayor estabilidad en estos preparados (71). Por ejemplo, usando AEDT o ácido bórico, se obtuvieron mejores resultados que con cloruro sódico, pero los isotonzantes que menos afectaron a la estabilidad del tiomersal fueron los no iónicos, tales como propilén glicol, glicerina o manitol.

Las razones por las cuales el cloruro sódico ejerce este efecto tan marcado sobre la descomposición del tiomersal no están demasiado claras. Estos investigadores sólo pudieron concluir que "hay evidencias que muestran que la descomposición del tiomersal en agua a ácido tiosalicílico e hidróxido de etilmercurio es una reacción reversible".

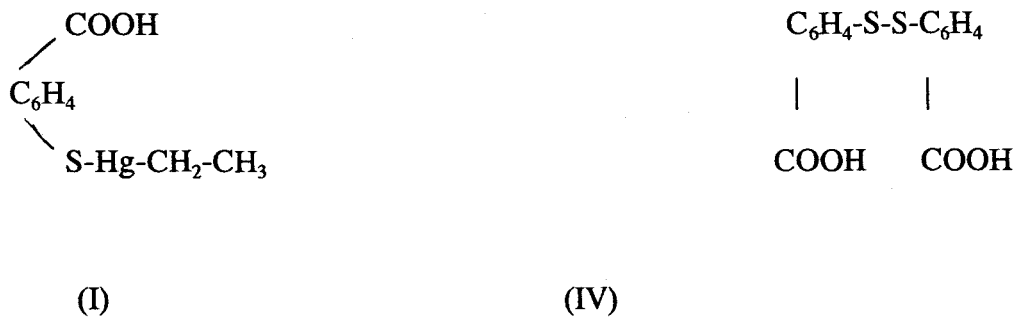
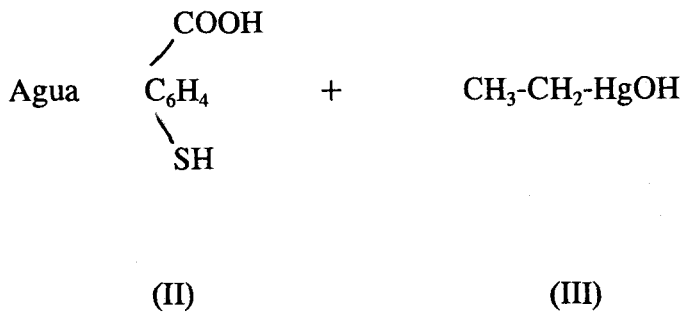
Basándose en esta posibilidad, argumentan que los mejores resultados obtenidos al isotonzar con AEDT y ácido bórico podrían deberse a que aunque sus aniones correspondientes pueden combinarse con el  $\text{Hg}^{++}$ , no muestran una marcada afinidad por él, interfiriendo menos que el cloruro sódico con la hipotética reacción de formación de tiomersal a partir del ácido tiosalicílico y del hidróxido de etilmercurio (reacción inversa). Por otra parte, los isotonzantes no iónicos apenas alterarían el "equilibrio" entre el tiomersal y el hidróxido de etilmercurio, no favoreciendo, por tanto, la descomposición del primero (71).

A pesar de ello, la mayoría de las soluciones que existen en el mercado incluyen en su formulación cloruro sódico como isotonzante. A este respecto, hay que señalar que algunos autores (72, 74, 75) señalan que la disminución de la actividad de las soluciones degradadas de tiomersal, evaluada por métodos microbiológicos, es menor que la esperada, ya que los productos de degradación tienen cierta actividad antimicrobiana.

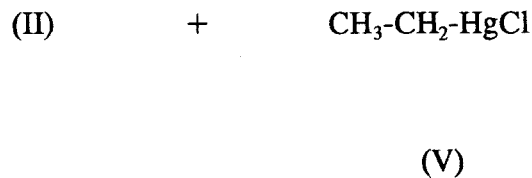
No obstante, no se conocen los efectos tóxicos de estos nuevos productos sobre el ojo y, además, es posible que dichas sustancias sean responsables de gran parte de los fenómenos alérgicos atribuidos al tiomersal y que son, hoy día, su principal limitación práctica (76).

### **1.3.2. Mecanismo de degradación**

Los productos de degradación del tiomersal, se han estudiado fundamentalmente por cromatografía en capa fina (TLC) (67, 70). Así, READER y cols. (70), proponen las siguientes reacciones de degradación:



Solución  
salina



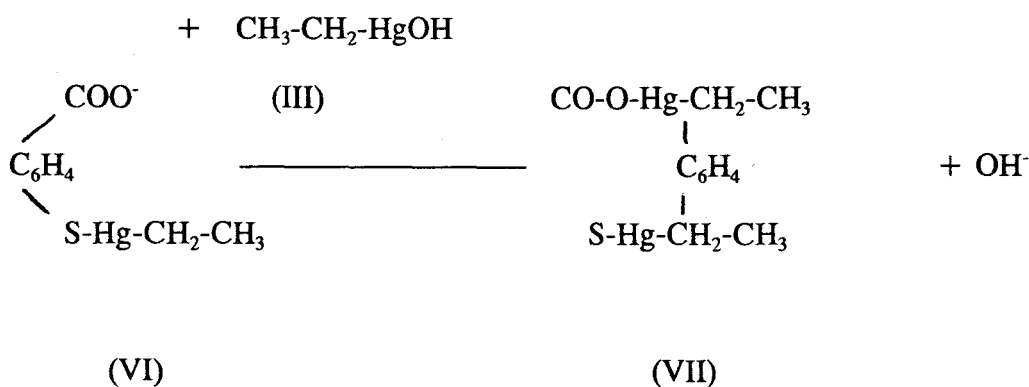
(I) tiomersal, (II) ácido tiosalicílico, (III) hidróxido de etilmercurio, (IV) ácido 2,2'-ditiosalicílico, (V) cloruro de etilmercurio

El segundo paso, tanto en agua como en solución salina, es una reacción redox en la que el ácido tiosalicílico (II) se oxida a ácido 2,2'-ditiosalicílico (IV) y el catión  $\text{Hg}^{++}$  del hidróxido o el cloruro de etilmercurio (III y V, respectivamente) se reduce a  $\text{Hg}^\circ$ .

Estos mismos autores, citando a TANAKA y MITSUNO, indican que la

descomposición del tiomersal en medio acuoso a ácido tiosalicílico e hidróxido de etilmercurio es una reacción reversible. Basándose en ello, estiman que el papel del cloruro de etilmercurio (V) puede ser el de desplazar el equilibrio, que parece ser que existe entre los compuestos I, II y III, siendo responsable de la inestabilidad del tiomersal (I) en presencia de iones cloruro, en particular, y haluros, en general.

POHLOUDEK-FABINI y cols. (67) defienden la hipótesis de que la presencia de oxígeno acelera todas estas reacciones. Para evidenciarlo, hacen pasar una corriente de aire a través de una solución, en principio transparente, de tiomersal, obteniendo un precipitado cristalino, blanco, con un punto de fusión de 155 - 157 °C, que coincide con el de una sustancia ya descubierta anteriormente por TRIKOJUS: el ester etilmercúrico del 2- etilmercurimercaptobenzoato (VII):



Además, se aprecian aún en la solución restos de tiomersal intacto, así como de los compuestos II, III y IV. Estos autores afirman que el compuesto VII se forma por esterificación del anión VI, procedente de la disociación del tiomersal, con el compuesto III que, a su vez, procede de la hidrólisis de I; y que dicha esterificación se produce en ausencia de otros aniones. El compuesto (VII) precipita, dada su baja

solubilidad en agua.

### **1.3.3. Influencia de los factores de la formulación en la estabilidad del tiomersal**

#### **1.3.3.1. Influencia del tipo de isotonzante**

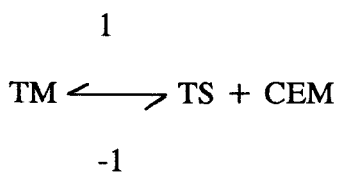
El proceso de degradación del tiomersal en soluciones oftálmicas ha sido estudiado exhaustivamente por CARABALLO y cols. (77). Puesto que las soluciones que contienen cloruro sódico exhiben en todo momento un comportamiento diferente de aquellas formuladas sin dicho isotonzante, estos autores han abordado su estudio por separado.

Para este estudio, (78) utilizaron varios tipos de isotonzantes: cloruro sódico, manitol, propilénico. Asimismo, prepararon soluciones sin isotonzar para su comparación con las anteriores.

Estos autores concluyeron tras sus investigaciones que el tipo de isotonzante utilizado ejerce un efecto decisivo sobre la velocidad de degradación del tiomersal y propusieron un mecanismo de degradación para las soluciones de tiomersal que contienen cloruro sódico (77). En dicho mecanismo distinguen dos etapas fundamentales que pasamos a detallar.

La primera de ellas estaría constituida por el proceso reversible siguiente:





siendo :

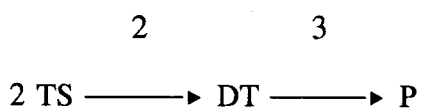
TM: tiomersal

TS: ácido tiosalicílico

CEM: cloruro de etilmercurio.

En presencia de aniones cloruro, la reacción 1 es muy rápida (67, 71, 72). Por lo tanto se producirá inicialmente un rápido descenso de la concentración de tiomersal y, en consecuencia, aparecerá bruscamente una gran cantidad de ácido tiosalicílico y de cloruro de etilmercurio.

La segunda etapa del proceso, simultánea a la anterior, estaría motivada por la formación de ácido ditiosalicílico y su posterior descomposición en productos de menor peso molecular:



siendo:

TS: ácido tiosalicílico

DT: ácido ditiosalicílico

P: productos de descomposición del ácido ditiosalicílico.

Estas reacciones evitan que el proceso reversible de la primera etapa alcance un estado de equilibrio y son responsables de que el tiomersal continúe degradándose una vez transcurrida la etapa inicial.

Se ha comprobado mediante análisis por HPLC, (77) que la dimerización del ácido tiosalicílico a ditiosalicílico (reacción "2") es un proceso irreversible en cantidades apreciables.

Como además, esta reacción es obviamente más lenta que la reacción "1", ya que, de lo contrario no se acumularía ácido tiosalicílico en ningún momento, estos autores afirman que la reacción "2" es la que controla la velocidad de degradación del tiomersal en lo que denominan como la segunda etapa del proceso.

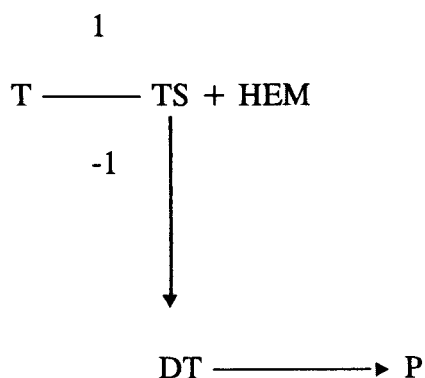
Por otra parte, (77) como la concentración de ácido ditiosalicílico decrece aproximadamente a partir de los cinco días de almacenamiento, estos autores concluyen que existe una reacción de descomposición del ácido ditiosalicílico y que la velocidad de dicha reacción, al cabo de este tiempo, se hace superior a la de la reacción "2".

No obstante, para las soluciones isotonizadas con manitol, propilénico y aquellas en las que no se incluía isotonzante, confirmaron la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de tiomersal remanente (79).

En estas soluciones, la degradación del tiomersal es mucho menos acusada, no existiendo concentraciones suficientes de ácido tiosalicílico o ditiosalicílico que permitan verificar el mecanismo de acción propuesto anteriormente.

No obstante, no pudieron descartar la posibilidad de que el mecanismo sea similar, con la diferencia de que, en este caso, la descomposición del tiomersal

(reacción "1") es mucho más lenta que en el caso anterior. Además en esta reacción no se formará cloruro de etilmercurio, sino hidróxido de etilmercurio. Las reacciones serían:



siendo:

T: tiomersal

TS: ácido tiosalicílico

DT: ácido ditiosalicílico

HEM: hidróxido de etilmercurio

P: productos de bajo peso molecular.

En este tipo de soluciones, el paso limitante del proceso no es la reacción de dimerización del ácido ditiosalicílico, sino la formación de este ácido a partir del tiomersal (reacción 1) (80).

Este resultado fue interpretado en el sentido de que la mayor fuerza iónica de las soluciones isotonzadas con cloruro sódico, fuera la causante de la inestabilidad del tiomersal.

De este modo, confirmaron experimentalmente las sospechas de otros autores, (67, 70, 71), sobre la responsabilidad de los iones cloruro en el proceso de

degradación del tiomersal; hecho que apuntaban aquellos, pero que no confirmaban experimentalmente en sus trabajos.

### 1.3.3.2. Estudio de la capacidad protectora de la trometamina

Algunos autores (81), afirman que la trometamina hace disminuir la velocidad de la reacción de degradación del tiomersal, por lo que podría usarse como protector en algunas formulaciones del conservante.

En estudios previamente realizados por nosotros (78), en los que realizamos un estudio estadístico de diversas soluciones con presencia o ausencia de trometamina, demostramos que la adición de trometamina disminuye la velocidad de descomposición del tiomersal.

Esta influencia es mucho más notoria en las soluciones que contienen cloruro sódico. Sin embargo, las soluciones isotonizadas con manitol, propilenglicol, o bien en las soluciones no isotonizadas, la adición de trometamina no ejerce efecto protector apreciable, en comparación con las muestras sin esta sustancia.

Puesto que la trometamina base da lugar, en las concentraciones utilizadas en este estudio, a un pH de alrededor de 10 unidades, en un nuevo estudio se incluyeron soluciones con un pH próximo a 7, para poder comprobar si el efecto protector observado se debía realmente a la trometamina o al pH alcalino que ésta proporciona (80).

Finalmente, demostramos que la trometamina ofrece, a pH fisiológico, un nivel de protección similar al observado en el estudio anteriormente citado (pH = 10), teniendo en cuenta, además, que cuando no se incluye cloruro sódico como

isotonizante, la trometamina no ejerce una acción protectora significativa (77).

Otra conclusión extraída de este ensayo es que el efecto protector obtenido con esta sustancia es independiente del tipo de material utilizado en el envase (vidrio, polietileno y polipropileno).

En cuanto al mecanismo por el que esta sustancia ejerce su acción protectora en las soluciones que contienen cloruro sódico, propusimos que se basa en retardar el proceso de dimerización del ácido tiosalicílico, con lo cual se producen menores cantidades de ácido ditiosalicílico que en las soluciones que no contienen trometamol, manteniéndose más elevados los niveles de ácido tiosalicílico y, en virtud del equilibrio que parece existir entre tiomersal, ácido tiosalicílico y cloruro de etilmercurio, se frena la degradación del primero (80).

Además, el mecanismo propuesto también aporta explicación razonable al hecho de que, en las soluciones que no contienen cloruro sódico, la trometamina no ejerza ninguna acción protectora, ya que en estas soluciones no existen cantidades suficientes de ácido tiosalicílico para que el equilibrio se desplace hacia la formación de tiomersal, o, al menos, que éste se degrade con menor velocidad.

#### 1.3.3.3. Influencia del pH

Para confirmar la influencia del pH en la estabilidad del tiomersal realizamos, asimismo, un estudio de estabilidad a cinco valores distintos de pH, para soluciones con y sin cloruro sódico (82).

En dicho estudio, el ajuste para pH ácidos se realizó por separado con ácido clorhídrico y nítrico, con el fin de establecer las posibles diferencias entre la

influencia del pH ácido y de la presencia del anión cloruro, en la degradación del tiomersal (78).

Las soluciones a las que se añadió ácido clorhídrico sufrieron una degradación mucho más acusada que aquellas cuyo pH se ajustó con ácido nítrico, demostrando que el anión cloruro, incluso a bajas concentraciones, produce una rápida descomposición del tiomersal.

De estos estudios, concluimos por tanto, que el tiomersal, tanto en solución acuosa como en presencia de cloruro sódico, se degrada más rápidamente en medio ácido que en medio neutro o alcalino. Esto difiere de las informaciones recogidas en algunas fuentes bibliográficas (1, 8), que afirman que el pH de máxima estabilidad se encuentra entre 5 y 7 unidades.

#### **1.3.3.4. Influencia del material de envase**

Varios autores (11, 67, 70, 83) han afirmado que el tipo de material utilizado para envasar las soluciones de tiomersal condicionaba su estabilidad.

RICHARDSON y cols. (11, 83) atribuyen la disminución en la concentración de tiomersal a fenómenos de permeación a través de los envases de plástico y puesto que el tiomersal, ácido tiosalicílico y ditiosalicílico presentan elevados puntos de fusión, arguyen que debe ser el hidróxido de etilmercurio el que atraviese la pared de plástico, ya que es el único componente presente suficientemente volátil para ello.

READER y cols. (70) afirman que en los envases de vidrio existe un buen balance de masas entre el ácido tiosalicílico formado y el tiomersal desaparecido, sin incluir en dicho balance al ácido ditiosalicílico, y sin cuantificar este último producto.

Sin embargo, en envases de plástico afirman no encontrar esta buena correlación entre tiomersal y ácido tiosalicílico, y atribuyen esta circunstancia a alguna forma de absorción en el plástico.

Según la bibliografía consultada (84 - 86), los tipos de plástico que, en general, cumplen los requisitos óptimos de flexibilidad, baja permeabilidad al vapor de agua, etc., para almacenar este tipo de soluciones son el polietileno y el polipropileno.

En estudios paralelos, hemos efectuado otro estudio (78) con 4 formulaciones distintas de tiomersal envasándolas en vidrio, polietileno y polipropileno, protegidas de la luz durante tres meses.

Los resultados obtenidos se esquematizan en la siguiente tabla:

	ClNa	Sin ClNa	ClNa + T <sup>(1)</sup>
VT <sup>(2)</sup>	+(5)	+++	≈ <sup>(6)</sup>
PE <sup>(3)</sup>	++	+	≈
PP <sup>(4)</sup>	+++	+	≈

(1): *Trometamina*

(2): *Vidrio Topacio*

(3): *Polietileno*

(4): *Polipropileno*

(5): *+ Intensidad en la degradación*

(6): *≈ Comportamiento similar en los tres tipos de envase.*

*Tabla 2.- Influencia del material de envase en las distintas soluciones.*

En lo referente a las soluciones que contienen cloruro sódico, los resultados

confirman lo hallado por otros autores anteriormente citados (70, 71): el tiomersal sufre una mayor degradación en los envases de plástico que en los de vidrio.

Sin embargo, en las soluciones formuladas sin cloruro sódico (tanto las que incluían trometamina, como las que no), encontraron un comportamiento contrario al esperado, sufriendo las soluciones almacenadas en vidrio, una mayor degradación que las envasadas en plástico. Este resultado va en contra de lo publicado por algunos autores en este sentido y justifica el hecho, habitual, de que todas las soluciones que no contienen cloruro sódico se envasen en recipientes de plástico.

Por otra parte hemos observado que en las fases finales del estudio (cuando se ha degradado gran parte del tiomersal), no se obtiene un balance de masas satisfactorio entre el tiomersal y el ácido tiosalicílico, ni siquiera, como sería de esperar entre el tiomersal, el ácido tiosalicílico y el ditiosalicílico, hecho que consideramos se debe a la aparición de nuevos productos de degradación que, por el momento, no se han podido cuantificar (78, 87).



#### 1.4. OBJETIVOS

Mediante el presente trabajo se continúa en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica la línea de trabajo que nuestro grupo de investigación abrió en el año 1990 encaminada a esclarecer la problemática asociada a la estabilidad de las soluciones de tiomersal.

El tiomersal es, hoy día, junto al gluconato de clorhexidina el conservante más utilizado en soluciones para lentes de contacto, tanto como conservante en soluciones de enjuagado y limpieza, (0.001 %), como en la desinfección química de lentes de contacto blandas (0.002 %). Por tanto, es empleado diariamente por millones de usuarios en todo el mundo. De todo ello, puede deducirse el interés práctico y económico del estudio de estos productos.

Los objetivos del presente proyecto son:

- Estudio de algunos factores de la formulación que alteran la estabilidad de las soluciones de tiomersal. Centraremos nuestras experiencias, fundamentalmente, en establecer la influencia de los isotonzantes utilizados (cloruro sódico, nitrato sódico y fosfato sódico dibásico) y de la fuerza iónica a partir de soluciones elaboradas con diferentes concentraciones de cloruro sódico, nitrato sódico y fosfato sódico dibásico.

- Dilucidar la cinética de degradación del tiomersal, mediante la aplicación de las ecuaciones cinéticas adecuadas y las aportaciones de los datos obtenidos en el apartado anterior.

- Estudio de la cinética de degradación del ácido tiosalicílico y el ácido

ditiosalicílico, principales productos de degradación del tiomersal, a partir de las soluciones de tiomersal y de soluciones elaboradas con dichos productos.

Como es bien conocido, el tiomersal sufre un proceso degradativo, que puede condicionar su acción antimicrobiana.

Sin embargo, algunos autores (72, 74, 75), han señalado que la disminución de la actividad de las soluciones degradadas de tiomersal, es menor que la esperada. Según ellos, una posible explicación a este hecho es el que sus productos de descomposición presenten, asimismo, actividad antimicrobiana.

Con el fin de poner de manifiesto esta hipótesis, y en caso afirmativo, comparar dicha actividad con la del propio tiomersal, se realizó un estudio microbiológico del tiomersal frente a ácido tiosalicílico y ácido ditiosalicílico, a distintas concentraciones y con varias especies bacterianas.

## **MATERIAL Y METODOS**

## 2.1. COMPUESTOS Y REACTIVOS

Los productos utilizados fueron: tiomersal<sup>1</sup>, ácido tiosalicílico<sup>2</sup>, ácido 2,2'-ditiosalicílico<sup>3</sup>, trometamina base<sup>3</sup>, clorhidrato de trometamina<sup>3</sup>, ácido fosfórico<sup>1</sup>, cloruro sódico<sup>1</sup>, nitrato sódico<sup>1</sup>, fosfato sódico dibásico<sup>1</sup>, hidróxido sódico<sup>1</sup>, ácido clorhídrico<sup>4</sup> y ácido nítrico<sup>5</sup>.

El metanol<sup>5,6</sup> usado en la cromatografía fue de calidad HPLC y el agua, recién destilada. Todos los productos fueron utilizados sin posterior purificación.

## 2.2. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

Para elaborar las diferentes soluciones a estudiar se procedió de la siguiente manera: se pesan todos los solutos, a excepción del tiomersal, en balanza electrónica (Mettler mod. AE-50) añadiéndose cada uno a un determinado envase, según la formulación de la que se trate.

Con el tiomersal se elabora una solución madre de un litro, al 0.002 % p/v, con el fin de asegurar la total homogeneidad de las concentraciones iniciales. El disolvente utilizado fue agua recientemente destilada.

De esta solución madre, se van añadiendo 100 mL a cada frasco. Esto permite suponer, a tiempo cero, una concentración relativa del 100 % en todos los

---

(1) Acofarma. Terrassa. Barcelona.

(2) Aldrich-Chemie. Steinheim.

(3) Sigma Chemical Co. St. Louis.

(4) Drogsa. Granollers. Barcelona.

(5) Panreac. Barcelona

(6) Merck. Darmstadt.

preparados.

A continuación, se filtran las soluciones y seguidamente analizamos alícuotas de todas ellas, realizando las medidas, al menos, por duplicado.

En la tabla 3 se recogen las composiciones de las soluciones objeto del estudio.

Sol.	T. (g)	NaCl (g)	NaNO <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	I
1	0.002				
2	0.002	0.9			0.154
3	0.002	0.6			0.103
4	0.002	0.3			0.051
5	0.002		1.34		0.158
6	0.002		0.893		0.105
7	0.002		0.446		0.052
8	0.002			1.80	0.380
9	0.002			1.20	0.254
10	0.002			0.6	0.127

*Tabla 3.- Composición porcentual de las soluciones 1 a 10. (T: tiomersal. I: fuerza iónica).*

Las cantidades añadidas de isotonzante (cloruro sódico, nitrato sódico, fosfato sódico dibásico, trometamina base y clorhidrato de trometamina) se determinaron mediante pruebas preliminares efectuadas con un osmómetro (Gonotec Osmomat 030), con el fin de elaborar soluciones isotónicas, premisa indispensable que deben reunir estos preparados de utilización directa sobre lentes de contacto blandas.

Las soluciones se mantienen a temperatura ambiente, en el laboratorio, estimándose una media de 21 °C.

Sol.	Acido TS. (g)	Acido DT. (g)	ClNa (g)	Tris base (g)	Tris HCl (g)
11	0.0015				
12	0.0015		0.9		
13	0.0015			0.0067	0.0702
14	0.0015		0.9	0.0067	0.0702
15		0.00075			
16		0.00075	0.9		

Tabla 4.- Composición porcentual de las soluciones 11 a la 16. (TS: tiosalicílico. DT: ditiosalicílico).

### 2.3. CUANTIFICACION DE TIOMERSAL Y SUS PRODUCTOS DE DEGRADACION

Para la determinación del tiomersal y sus productos de descomposición, elegimos como técnica analítica la cromatografía líquida de alta resolución.

El cromatógrafo utilizado estaba compuesto por:

- bomba de flujo constante (Kontron mod. 420).
- inyector de válvula rotatoria dotado con un bucle que introduce 20  $\mu$ L por inyección.

- detector espectrofotométrico (Kontron mod. 432) de longitud de onda variable, (que seleccionamos en 222 nm basándonos en datos bibliográficos (25) y dotado de una microcélula de 8  $\mu$ L de capacidad).

- registrador-integrador (Konik mod. DataJet 4600).

El sistema cromatográfico está formado por:

- fase estacionaria Lichrocart 4 - 4 LiChrospher® 100 RP - 18 de partículas esféricas de octadecilsilano (ODS) de 5 micras de diámetro, en columna de 125 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno.

- precolumna, Lichrocart 4 - 4 LiChrospher® 100 RP - 18 de partículas esféricas de octadecilsilano (ODS) de 5 micras de diámetro.

El eluyente cromatográfico que se utilizó, después de la realización de las pruebas oportunas, consistió en una mezcla de metanol, agua y ácido fosfórico en proporción 62 / 38 / 0.9. El ácido fosfórico añadido proporciona un pH de, aproximadamente, 2.5 unidades.

Se fijó un flujo de 1 mL/min., para el cual la presión oscila entre 108 y 103 bares. La velocidad del papel se fijó en 1 cm/min. y se mantuvo la temperatura ambiente.

Para cuantificar la concentración de los distintos compuestos estudiados, se realizaron rectas de calibrado para cada uno de ellos. Las características de elaboración de estas rectas, así como sus parámetros estadísticos de mayor interés, se exponen en el apartado de discusión de los resultados.

Además, para corregir la variación en las condiciones cromatográficas, se

inyectaron patrones de cada producto a las concentraciones correspondientes, intercalados entre el resto de las muestras, con tres repeticiones.

## 2.4. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Para efectuar el estudio microbiológico del tiomersal y de sus productos de degradación, los ácidos tiosalicílico y ditiosalicílico se elaboraron inicialmente soluciones concentradas de las sustancias objeto de estudio.

Posteriormente se prepararon dos lotes de discos para cada una de las tres sustancias; mediante una jeringa Hamilton Microliter® de 10  $\mu$ L, se impregnaron los distintos discos con una alícuota de las anteriores soluciones, de tal modo que los lotes de discos contuvieron 0.002 g y 0.001 g de tiomersal, ácido tiosalicílico y ácido ditiosalicílico. Una vez impregnados los discos se esterilizaron por radiación ultravioleta en campana de flujo laminar.

Por otra parte, se prepararon una serie de placas de Petri. Se eligieron las siguientes Enterobacterias para el presente estudio por tener capacidad para provocar enfermedades oculares:

- 1.- *Escherichia coli*
- 2.- *Serratia marcescens*
- 3.- *Staphilococcus aureus*
- 4.- *Pseudomonas aeruginosa*
- 5.- *Proteus mirabilis*



El medio de cultivo utilizado para el enriquecimiento de las bacterias es "agar nutritivo", también llamado "agar común", que contiene caldo común, cuya composición es a base de extracto de carne, peptona, cloruro sódico, agua destilada y agar como gelificante; el pH se ajustó a 7.2 unidades.

A partir de un cultivo puro de cada una de estas bacterias se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril, obteniéndose una densidad óptica a 600 nm de longitud de onda igual para todas ellas.

El inóculo se sembró en la placa de agar común en tres direcciones, girando la placa cada vez 60 °C, con un escobillón que previamente fue mojado en la suspensión bacteriana, con la finalidad de obtener un crecimiento confluyente.

Sobre las placas anteriormente sembradas se colocaron los distintos discos conteniendo tiomersal, ácido tiosalicílico y ácido ditiosalicílico, con unas pinzas flameadas y teniendo en cuenta que debe existir una separación mínima entre ellos para evitar que las zonas de inhibición se superpongan.

Una vez colocados los discos se presionó ligeramente con la punta de la pinza para asegurar un contacto firme con el agar. Finalmente se incubaron las placas unas 16 horas a 37 °C para permitir el crecimiento bacteriano, lo cual nos permitirá observar si estos productos tienen o no un efecto inhibitorio sobre las Enterobacterias estudiadas por la presencia o no de un halo de inhibición alrededor de cada uno de los discos, basándose en la difusión del antimicrobiano en la placa de agar.

En el caso del tiomersal, su carácter antimicrobiano se estudió previamente por adición directa al medio de cultivo antes de solidificar. Una vez preparado el medio se sembraron las distintas bacterias en estrías.

## **2.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO**

Los resultados que se han obtenido durante el desarrollo de este trabajo experimental han sido sometidos a diversos análisis estadísticos mediante algunos programas comerciales desarrollados para ordenadores personales, así como mediante programas originales elaborados en nuestro Departamento.

Los diversos datos han sido procesados mediante ordenadores IBM (Ordenador IBM Personal System/2 Model 30) y Tandon (Ordenador Tandon mod. 286).

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### 3.1 VALORACION CROMATOGRAFICA

Como ya hemos indicado, existen distintas técnicas utilizadas para la determinación del tiomersal. Entre otras, podemos citar la absorción atómica, recogida en los textos oficiales de la USP XXII, y también métodos polarográficos, colorimétricos, cromatográficos, etc.

De todos ellos, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se presenta como la técnica de elección, por ser el único método específico para el análisis del tiomersal, en presencia de sus productos de degradación.

En cuanto a la fase móvil, tras varios ensayos, decidimos optar por aquella que reduciendo la duración el análisis al mínimo posible, proporcionase suficiente resolución entre los picos del tiomersal y los de sus productos de descomposición que, según la bibliografía consultada, podrían interferir a 222 nm: ácido tiosalicílico y ácido ditiosalicílico.

La composición que mejor aunó estos dos objetivos fue: metanol /agua / ácido fosfórico, 65: 35: 0.9.

Posteriormente, y como ya indicamos en el apartado de Material y Métodos, se realizaron rectas de calibrado para cada una de las tres sustancias estudiadas por HPLC.

Coeficiente de determinación : 0.999929		Término independiente : 3433.82			
Coeficiente de correlación : 0.999965		Error estándar : 8387.14			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	9.967815 10 <sup>12</sup>	9.967815 10 <sup>12</sup>	141701	<0.0001
Residuales	10	7.034419 10 <sup>8</sup>	70344190		
Total	11	9.968518 10 <sup>12</sup>			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
1.326575 10 <sup>8</sup>	0.999965	352408	376.431	<0.0001	

Tabla 5.- Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado del tiomersal.

Coeficiente de determinación : 0.999931		Término independiente : -2238.63			
Coeficiente de correlación : 0.999966		Error estándar : 2209.28			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	4.262523 10 <sup>11</sup>	4.262523 10 <sup>11</sup>	87330.3	<0.0001
Residuales	6	29285524	4880921		
Total	7	4.262816 10 <sup>11</sup>			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
4.953545 10 <sup>8</sup>	0.999966	1676230	295.517	<0.0001	

Tabla 6.- Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado del ácido tirosalíclico.

Coeficiente de determinación : 0.999556		Término independiente : 3258.75			
Coeficiente de correlación : 0.999778		Error estándar : 1798.89			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	4.375208 10 <sup>10</sup>	4.375208 10 <sup>10</sup>	13520.3	<0.0001
Residuales	6	19416138	3236023		
Total	7	4.377150 10 <sup>10</sup>			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
2.942199 10 <sup>8</sup>	0.999778	2530337	116.277	<0.0001	

Tabla 7.- Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado del ácido ditiosalicílico.

Los parámetros estadísticos más importantes de las diferentes rectas de calibrado aparecen en las tablas 5, 6 y 7. En ellas cabe destacar los elevados coeficientes de correlación obtenidos, los cuales se mantienen por encima de 0.999 en todas las rectas elaboradas. Estos datos, unidos a los excelentes valores que toma F en todos los casos, aseguran una gran exactitud en el cálculo de las concentraciones.

También hemos de señalar que para efectuar el estudio cinético del ácido tiosalicílico y ditiosalicílico se tuvo que utilizar, debido a problemas técnicos, una columna distinta que para el estudio del ácido ditiosalicílico y tiomersal, pero de iguales características; sin embargo, puesto que la recta de calibración es un parámetro dependiente de las características de la columna, resultó necesario elaborar de nuevo, las rectas de calibrado del ácido tiosalicílico.

Además, puesto que el ácido tiosalicílico se dimeriza parcialmente en agua con bastante rapidez, resulta importante señalar que para elaborar su recta de calibrado,

se cuantificó en cada cromatograma el ácido ditiosalicílico formado y se restó la cantidad correspondiente a la concentración inicial de ácido tiosalicílico.

Los parámetros estadísticos más importantes de las diferentes rectas de calibrado, utilizadas en el estudio cinético del ácido tiosalicílico y diotiosalicílico aparecen en las tablas 8 y 9, en las cuales cabe destacar los elevados coeficientes de correlación obtenidos, los cuales se mantienen por encima de 0.999 en todas las rectas elaboradas.

Como podemos observar, existe una gran similitud entre los diferentes parámetros de ambas rectas, lo que confirma, por una parte, la reproductibilidad de la técnica empleada y por otra, nos aseguramos que la utilización de columnas diferentes no va a ejercer ninguna influencia en los resultados obtenidos.

Coeficiente de determinación : 0.999302		Término independiente : 215.263			
Coeficiente de correlación : 0.999651		Error estándar : 7130.75			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	4.365002 10 <sup>11</sup>	4.365002 10 <sup>11</sup>	8584.48	<0.0001
Residuales	6	3.050855 10 <sup>8</sup>	50847586		
Total	7	4.368053 10 <sup>11</sup>			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
4.892950 10 <sup>8</sup>	0.999651	5280970	92.6525	<0.0001	

Tabla 8.- Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado del ácido tiosalicílico.

Coeficiente de determinación : 0.999798		Término independiente : 684.675			
Coeficiente de correlación : 0.999899		Error estándar : 1257.76			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	4.698457 10 <sup>10</sup>	4.698457 10 <sup>10</sup>	29700.1	<0.0001
Residuales	6	9491789	1581965		
Total	7	4.699406 10 <sup>10</sup>			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
3.048950 10 <sup>8</sup>	0.999899	1769176	172.337	<0.0001	

*Tabla 9.- Principales parámetros estadísticos de la recta de calibrado del ácido ditiosalicílico.*



## 3.2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

### 3.2.1. Influencia del tipo de isotonzante

Para estudiar dicha influencia, se tomaron tres tipos de sales, cloruro sódico, nitrato sódico y fosfato sódico dibásico, todas ellas en cantidades isotónicas.

Aunque el comportamiento de las soluciones isotonzadas con cloruro sódico es totalmente conocido, ya que han sido ampliamente estudiados por otros autores, como ya se ha expuesto en el apartado de Introducción, esta solución fue nuevamente preparada y analizada, con el fin de que sirviera como referencia, a la hora de compararla con las soluciones que contenían las otras dos sales como isotonzantes.

Por otra parte, como sabíamos por referencias anteriores, que las soluciones que contenían cloruro sódico se degradaban con gran rapidez en los primeros instantes, para evitar la pérdida de información en esta fase inicial de descomposición, se procedió a realizar la primera medida del proceso de descomposición inmediatamente después de la elaboración de todas las soluciones.

Como puede observarse en la figura 1, se confirma que el descenso inicial de las concentraciones de tiomersal en presencia de cloruro sódico es prácticamente instantáneo. Por tanto, ratificamos las conclusiones obtenidas por CARABALLO (80) de que en presencia de aniones cloruro, la reacción de degradación del tiomersal hacia ácido tiosalicílico y cloruro de etilmercurio es una reacción muy rápida.

Como se observa también en dicha figura, la aparición del ácido tiosalicílico se produce de forma brusca, casi explosiva, lo que indica claramente que la primera etapa de la reacción de descomposición del tiomersal, anteriormente descrita con

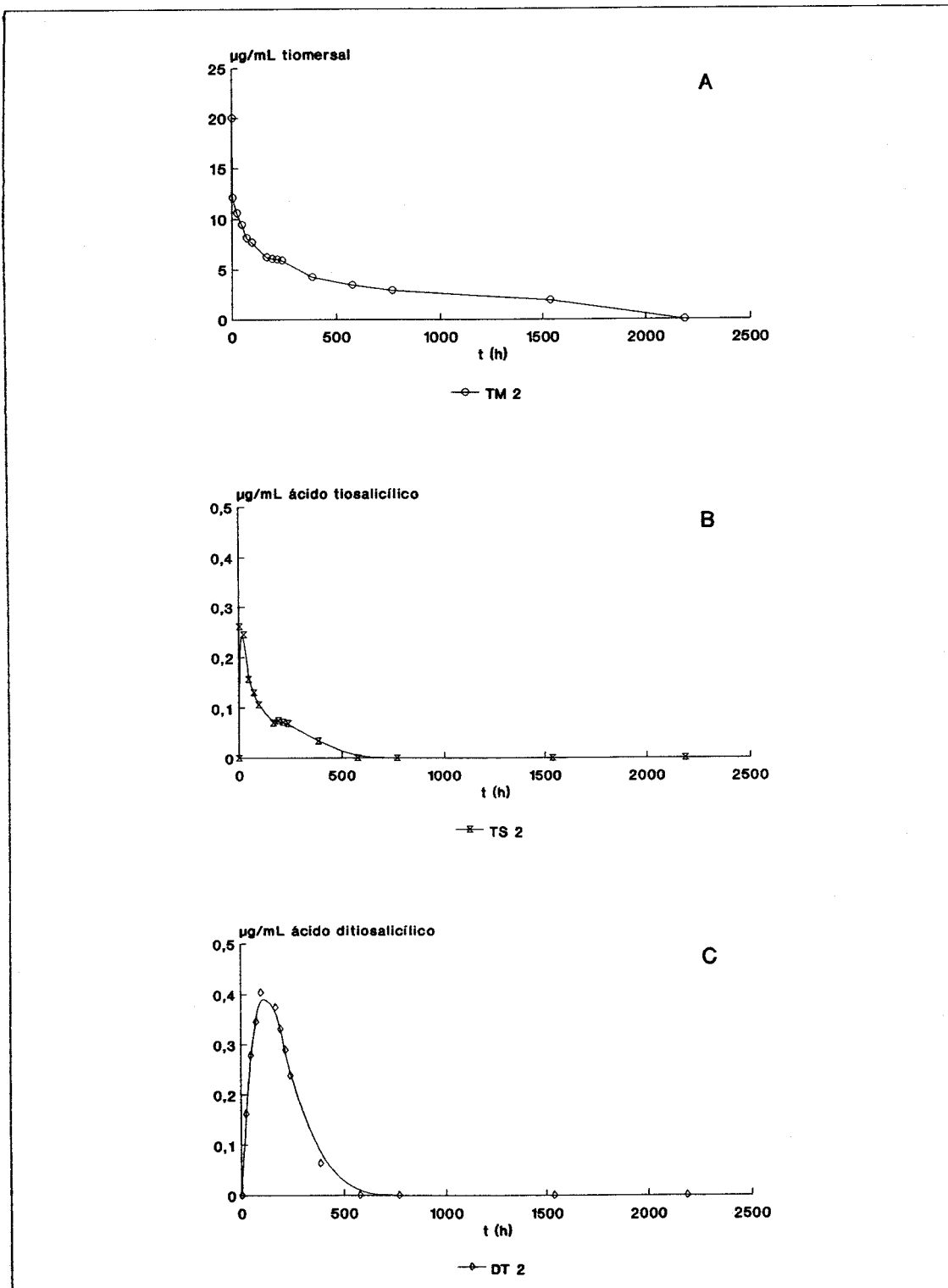


Fig. 1.- Evolución de las concentraciones de tiomersal (A), ácido tiosalicílico (B) y ácido ditirosalicílico (C) en presencia de cloruro sódico al 0.9 %.

amplitud en el apartado de Introducción, está muy desplazada hacia la formación del ácido tiosalicílico.

En cuanto a la segunda etapa del proceso degradativo, se confirma que la dimerización del ácido tiosalicílico hacia ácido ditiosalicílico es un proceso irreversible, además de ser una reacción más lenta, puesto que no se acumula ácido tiosalicílico en ningún momento (vid. figura 1).

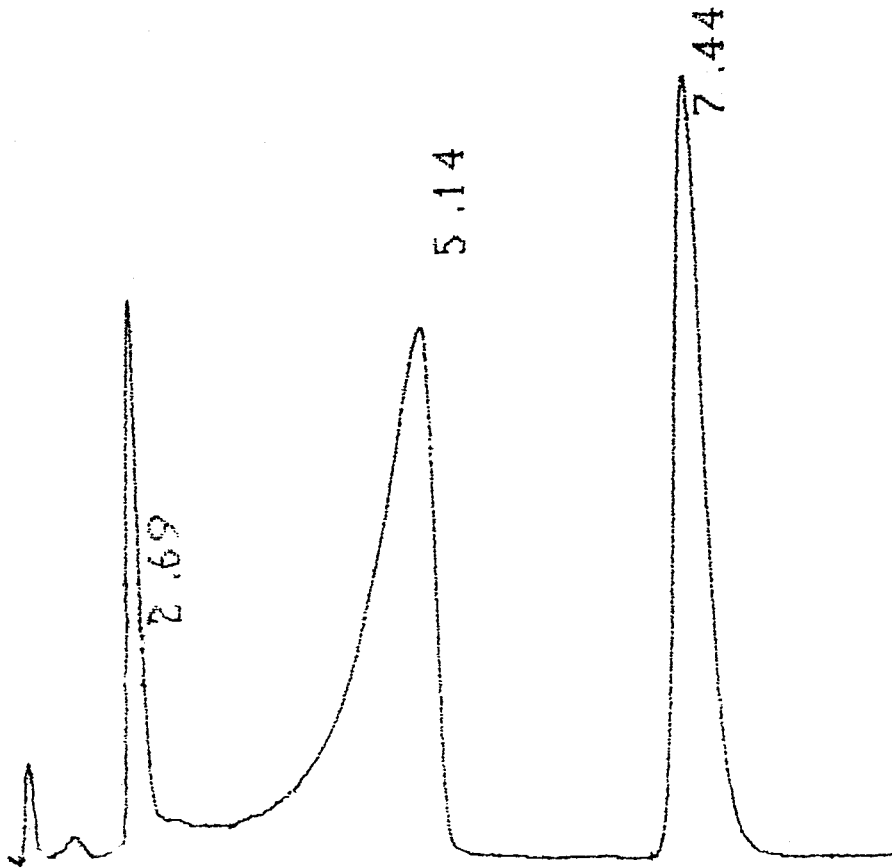
Por otra parte, se observa que a partir de los cinco días de almacenamiento, la concentración de ácido ditiosalicílico decrece, hecho indicativo de una preponderancia del proceso degradativo frente al de formación de dicho ácido.

También debemos señalar, por otra parte, que en las fases finales de nuestro estudio, cuando se ha degradado gran parte del tiomersal, no hemos obtenido un balance satisfactorio entre el tiomersal y el ácido tiosalicílico, ni siquiera, como sería de esperar entre el tiomersal, el ácido tiosalicílico y el ditiosalicílico, hecho que consideramos se debe a la aparición de nuevos productos de degradación que, por el momento, no hemos podido cuantificar.

Los picos correspondientes a estas sustancias se pueden observar en la zona inicial del cromatograma recogido en la figura 2.

Sin embargo, la naturaleza de estos compuestos, ya señalados también por otros autores (80), no ha podido ser confirmada. Únicamente, en base a los cromatogramas obtenidos y por su reducido tiempo de retención, pensamos que pueden ser sustancias de bajo peso molecular y de alta polaridad.

Por otra parte, podemos suponer que la degradación del tiomersal para originar ácido tiosalicílico y cloruro de etilmercurio, en presencia de iones cloruro, es una



*Fig 2.- Cromatograma en el que pueden observarse los picos de absorbancia correspondientes a la elución del tiomersal (tiempo de retención: 5.14), ácido tiosalicílico (tiempo de retención: 2.69) y ácido ditiosalicílico (tiempo de retención: 7.44).*

reacción de tipo sustitución nucleofílica. El ión cloruro tiene carácter de base débil mientras que el mercurio tiene carácter de ácido débil; así, el anión cloruro produciría un ataque nucleofílico sobre el mercurio, siendo el grupo saliente consecuencia de esta reacción el anillo aromático que porta el grupo carboxilo y el azufre, que, posteriormente, originará el ácido tiosalicílico.

Por otro lado, el grupo  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-Hg}^+$ , junto con el ión cloruro, produciría cloruro de etilmercurio.

Todo este mecanismo degradativo explicaría el hecho experimental de que los iones nitrato y fosfato dibásico no afectasen a la estabilidad del tiomersal.

En efecto, los grupos nitrato y fosfato dibásico, no tendrían tanta afinidad por el mercurio como el ión cloruro, por lo que no actuarían catalizando la descomposición del tiomersal.

Por el contrario, en aquellas soluciones que contenían nitrato sódico y fosfato sódico dibásico como isotonzante y la solución no isotonzada, apreciamos una gran semejanza entre los perfiles de las curvas obtenidas, observándose en todas ellas que no hay prácticamente degradación del tiomersal en el tiempo (vid. figura 3).

En todos estos casos, no podemos descartar la posibilidad de que a mayor largo plazo, estas soluciones muestren un mecanismo degradativo similar, pero en la duración de nuestros ensayos de 91 días, éste no ha podido ser puesto de manifiesto.

Se realizaron diferentes estudios (71) acerca de la influencia que la naturaleza del isotonzante (iónico o no iónico), ejerce sobre la degradación del tiomersal, empleando para ello distintos isotonzantes. Entre los no iónicos emplearon el propilenglicol, glicerina y manitol, mientras que los iónicos utilizados fueron cloruro

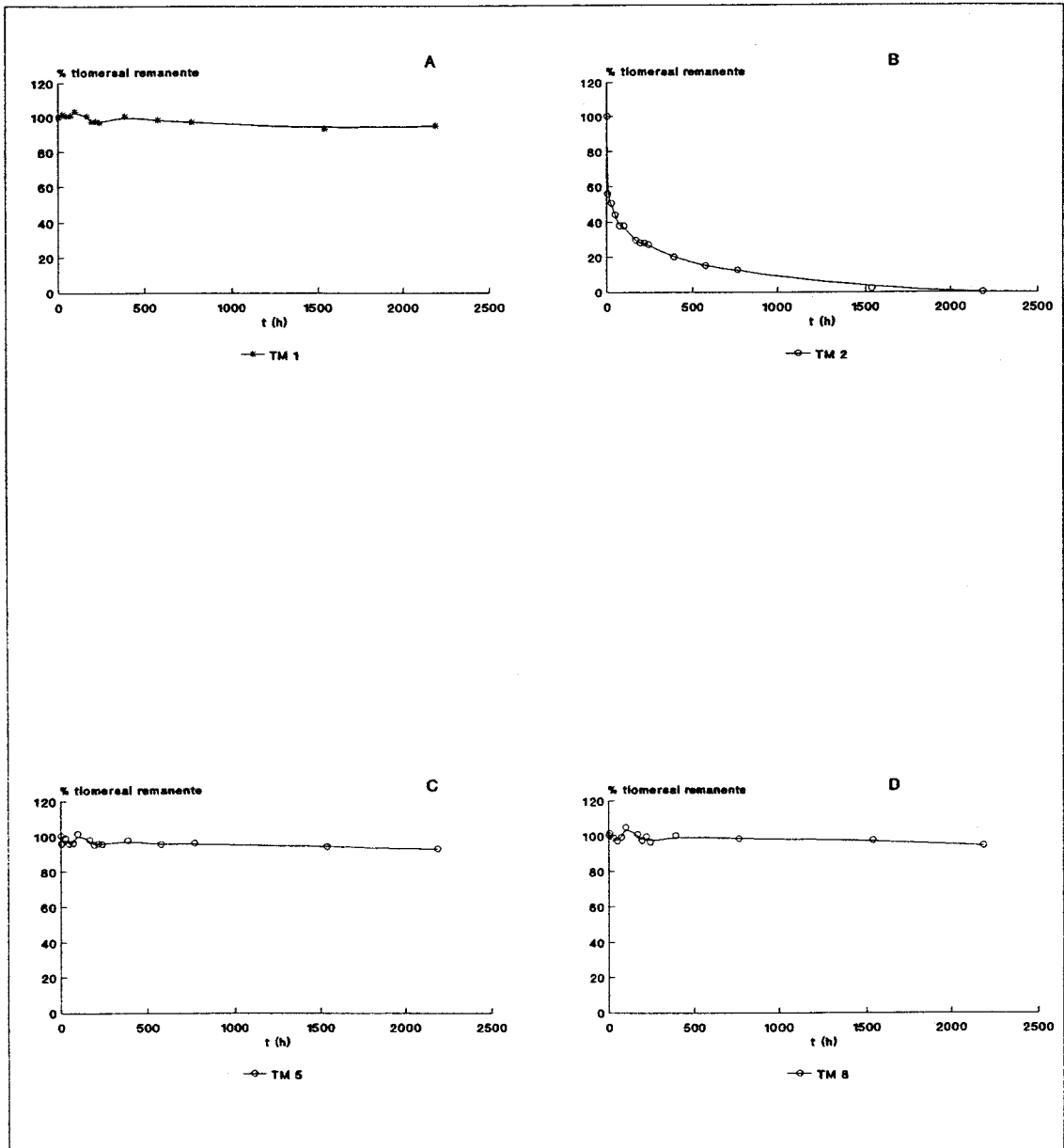


Fig. 3.- Influencia del tipo de isotonzante sobre la degradación del tiomarsal. (A: sin isotonzar B: cloruro sódico C: nitrato sódico D: fosfato sódico dibásico)

sódico, ácido bórico y AEDT. Se concluyó que los isotonzantes de naturaleza iónica afectan a la degradación del tiomersal en mayor grado que los isotonzantes no iónicos.

Sin embargo, en nuestros estudios comprobamos que, al utilizar tanto el nitrato sódico como el fosfato sódico dibásico, no se produce degradación del tiomersal, por lo que cuestionamos en cierta medida la generalización realizada por este autor.

En vista de que las soluciones isotonzadas con nitrato sódico y fosfato sódico dibásico mostraban muy buenos resultados y podían presentarse como una alternativa efectiva al empleo del cloruro sódico, decidimos determinar otra serie de parámetros que pudieran ser limitantes a la hora de su empleo a nivel farmacéutico, tales como su solubilidad y fundamentalmente el pH, ya que un pH excesivamente ácido o básico podría producir irritaciones oculares de importancia.

Así, a nivel de solubilidad no encontramos ningún problema, ya que ambas sustancias demostraron poseer una alta solubilidad en agua.

Los resultados obtenidos en las determinaciones del pH, mostraron que la solución isotonzada con nitrato sódico presentaba un pH de 4.91 unidades, mientras que el pH de la solución isotonzada con fosfato sódico dibásico era de 8.6 unidades.

Por tanto, aunque la solución isotonzada con nitrato sódico proporcionaba un pH más compatible con los ojos, no podemos descartar el empleo del fosfato sódico dibásico como isotonzante alternativo, ya que, si una vez lavadas las lentes, éstas se sumergen en una solución salina isotónica, es previsible que este alto valor de pH disminuya hacia valores más fisiológicos.

Por otra parte, no hemos hallado referencias bibliográficas acerca del hecho de

que estas soluciones salinas puedan afectar al material de que están constituidas las lentes de contacto blandas, que es el polihidroxietilmetacrilato (pHEMA), pero resulta evidente que habría que realizar análisis más profundos, para determinar si alguna de estas dos sales se pueden quedar adheridas al pHEMA, antes de plantear su uso a escala industrial.

### 3.2.2. Influencia de la fuerza iónica

Con el fin de estudiar la posible influencia que la fuerza iónica pudiera ejercer en la estabilidad del tiomersal, se procedió a elaborar varias soluciones cada una con un valor diferente de fuerza iónica.

Para el cálculo del valor de la fuerza iónica, se recurrió a la fórmula descrita en el apartado de Introducción, mientras que los distintos valores de fuerza iónica de cada solución quedan recogidos en la tabla 3.

Tomamos para cada sal tres cantidades, su concentración isotónica, un tercio y dos tercios de la isotónica.

Como es lógico, las soluciones preparadas con cloruro sódico y nitrato sódico mostraron un valor similar de fuerza iónica ya que tienen la misma carga, mientras que las soluciones preparadas con fosfato sódico dibásico mostraron valores superiores, concretamente, el doble.



### 3.2.2.1. En la estabilidad del tiomersal

En la figura 4, se recoge la evolución de los niveles de tiomersal en las soluciones isotonizadas con cloruro sódico, donde se observa claramente como existe una relación directa entre la fuerza iónica de dichas soluciones y la degradación del tiomersal.

Así, y aunque la permanencia efectiva de tiomersal es similar en todas ellas, la evolución de dichos perfiles presenta ligeras diferencias.

Frente a una primera etapa de la degradación comprendida entre 0 y 250 horas, donde podemos observar similares características, independientemente del valor de fuerza iónica, encontramos una segunda etapa, a partir de las 250 horas, en la cual los niveles de tiomersal remanente son superiores a medida que disminuye el valor de la fuerza iónica.

Aparte, estos resultados ponen de manifiesto, al menos *a priori*, la influencia negativa que ejerce la fuerza iónica sobre la estabilidad del tiomersal en las soluciones isotonizadas con cloruro sódico.

Sin embargo, cuando el isotonizante aplicado es el nitrato sódico (vid. figura 5), las cantidades de tiomersal son prácticamente constantes en el tiempo, independientemente del valor de fuerza iónica, lo que indica que para este isotonizante, la fuerza iónica no ejerce efecto apreciable sobre la degradación del tiomersal.

Por otra parte, al comparar individualmente las soluciones elaboradas con cloruro sódico frente a las elaboradas con nitrato sódico, podemos observar que con valores similares de fuerza iónica, en las soluciones elaboradas con cloruro sódico se producía un descenso de tiomersal, menor cuanto menor a medida que disminuía la

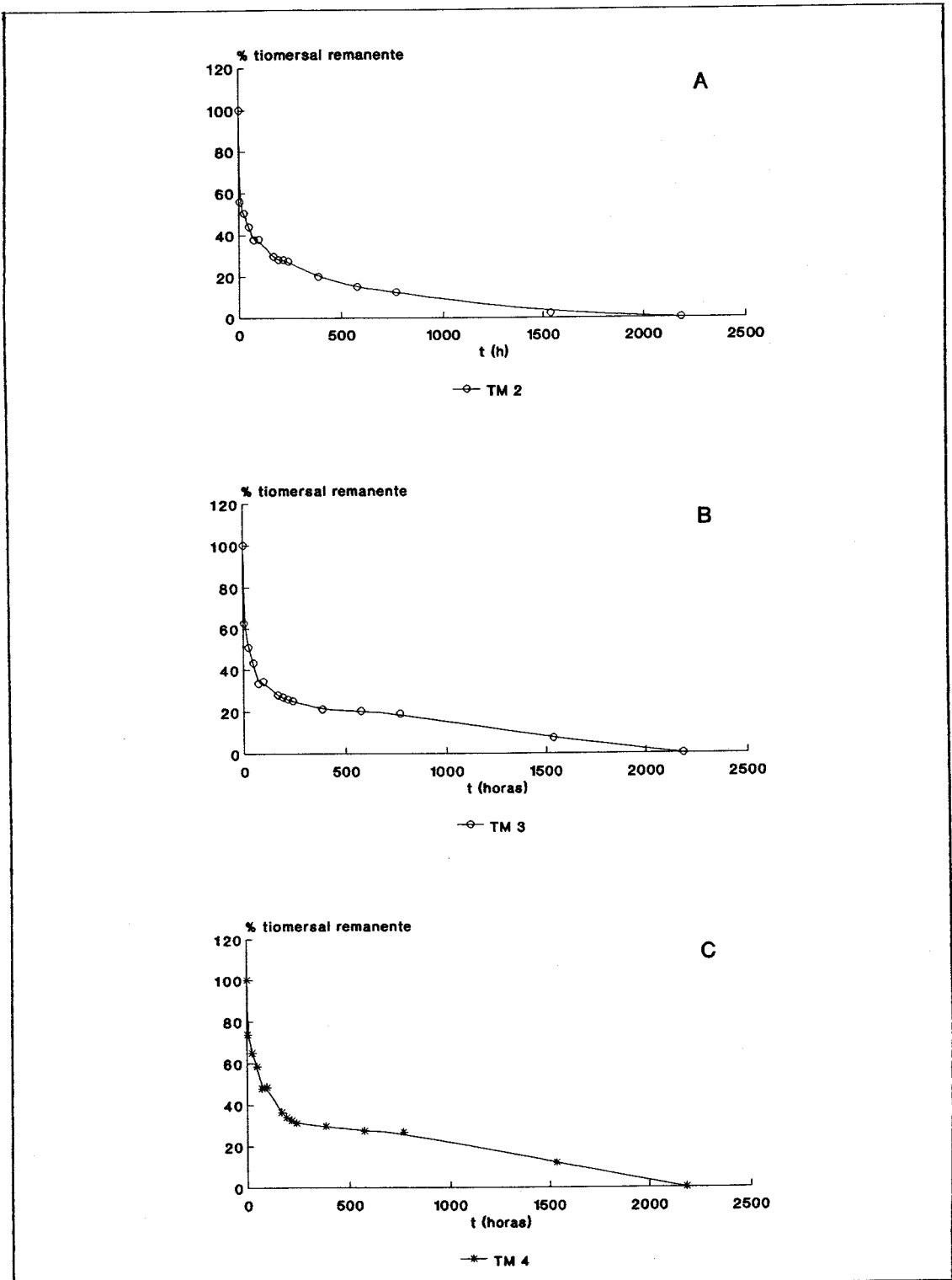


Fig. 4.- Influencia de la fuerza iónica sobre la degradación del tiomersal. (A: 0.9 %, B: 0.6 %, C: 0.3 % en cloruro sódico).

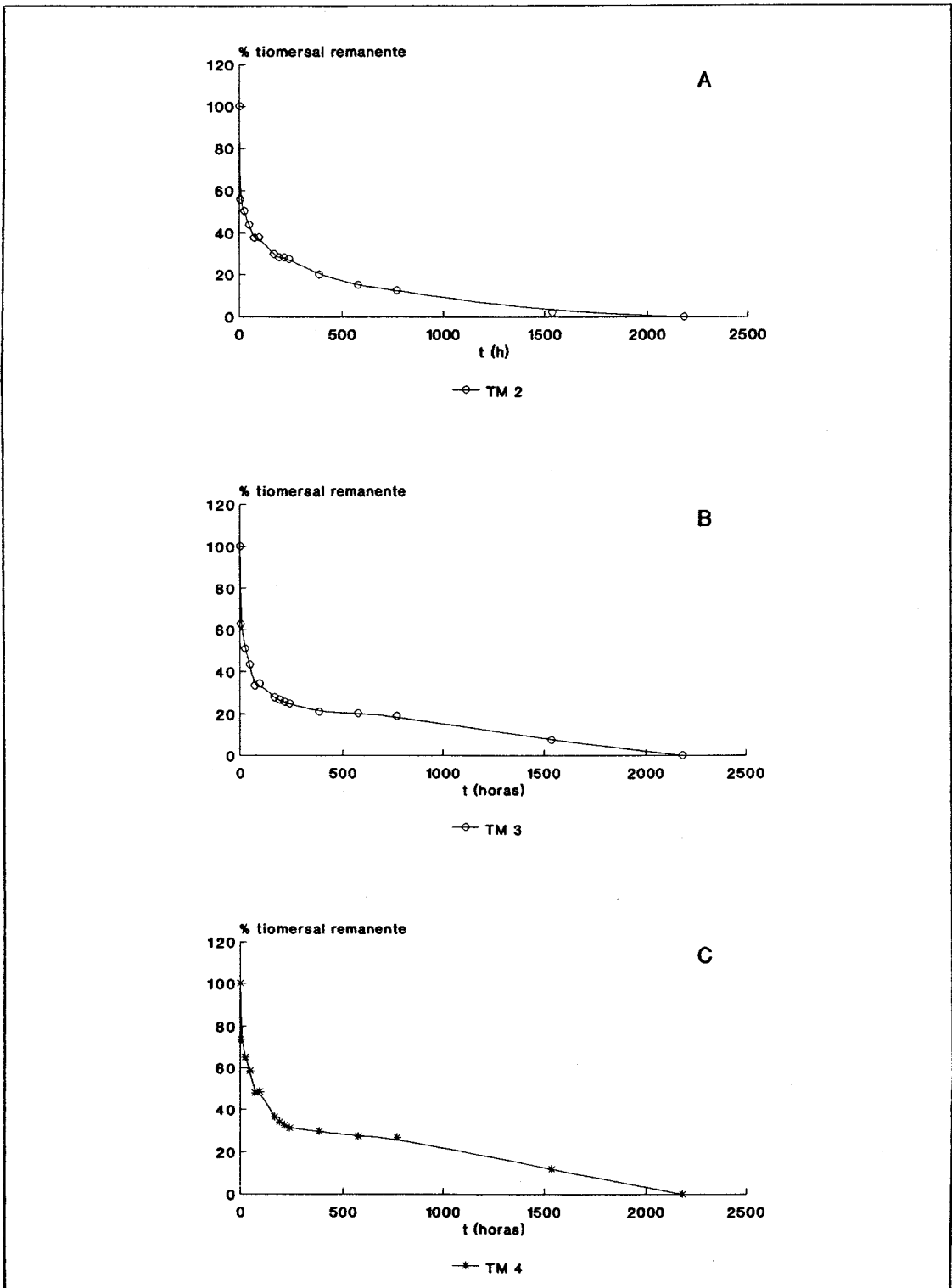


Fig. 5.- Influencia de la fuerza iónica debida al cloruro sódico en la concentración de ácido tiosalicílico. (A: 0.9 % B: 0.6 %, C: 0.3% en cloruro sódico).

fuerza iónica; sin embargo, a igualdad de fuerza iónica, las soluciones elaboradas con nitrato sódico no se degradaban.

Situación similar se observa cuando el isotonzante empleado es el fosfato sódico dibásico, aunque en estas soluciones, los valores de fuerza iónica sean muy superiores a los anteriores (vid. figura 6).

Todos estos resultados ponen en evidencia que la fuerza iónica no ejerce una influencia determinante en la degradación del tiomersal, siendo, más bien, el tipo de anión, en concreto el ión cloruro, el principal responsable en el proceso degradativo de esta sustancia.

#### **3.2.2.2. En la estabilidad del ácido tiosalicílico**

En la figura 7, se recogen los niveles de ácido tiosalicílico remanente en función del tiempo para las soluciones isotonzadas con cloruro sódico a distintos valores de fuerza iónica.

Como era de esperar, en la solución con mayor valor de fuerza iónica, se produce una mayor cantidad de ácido tiosalicílico inicialmente, ya que era esta solución donde más rápidamente se degrada el tiomersal.

Así, mientras que en la solución de mayor fuerza iónica, (vid. figura 7) los niveles de ácido tiosalicílico durante las primeras 240 horas del ensayo se mantuvieron superiores a  $0.1 \mu\text{g/mL}$ , en las soluciones 3 y 4, de fuerza iónica intermedia y baja, los valores alcanzados fueron netamente inferiores:  $0.05$  y  $0.04 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

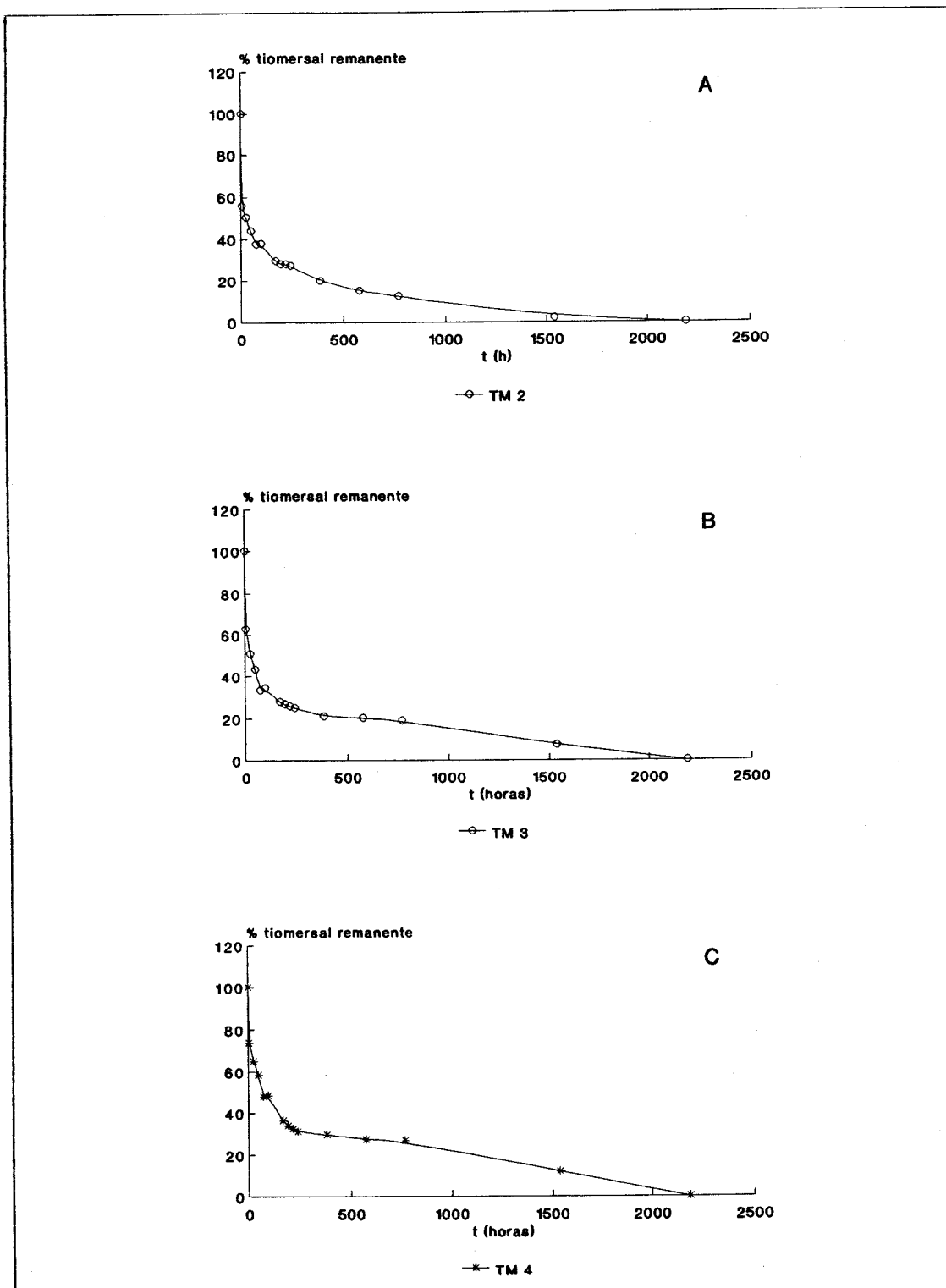


Fig. 6.- Influencia de la fuerza iónica debida al cloruro sódico sobre la concentración de ácido ditiosalicílico. (A: 0.9 %, B: 0.6 %, C: 0.3% en cloruro sódico).

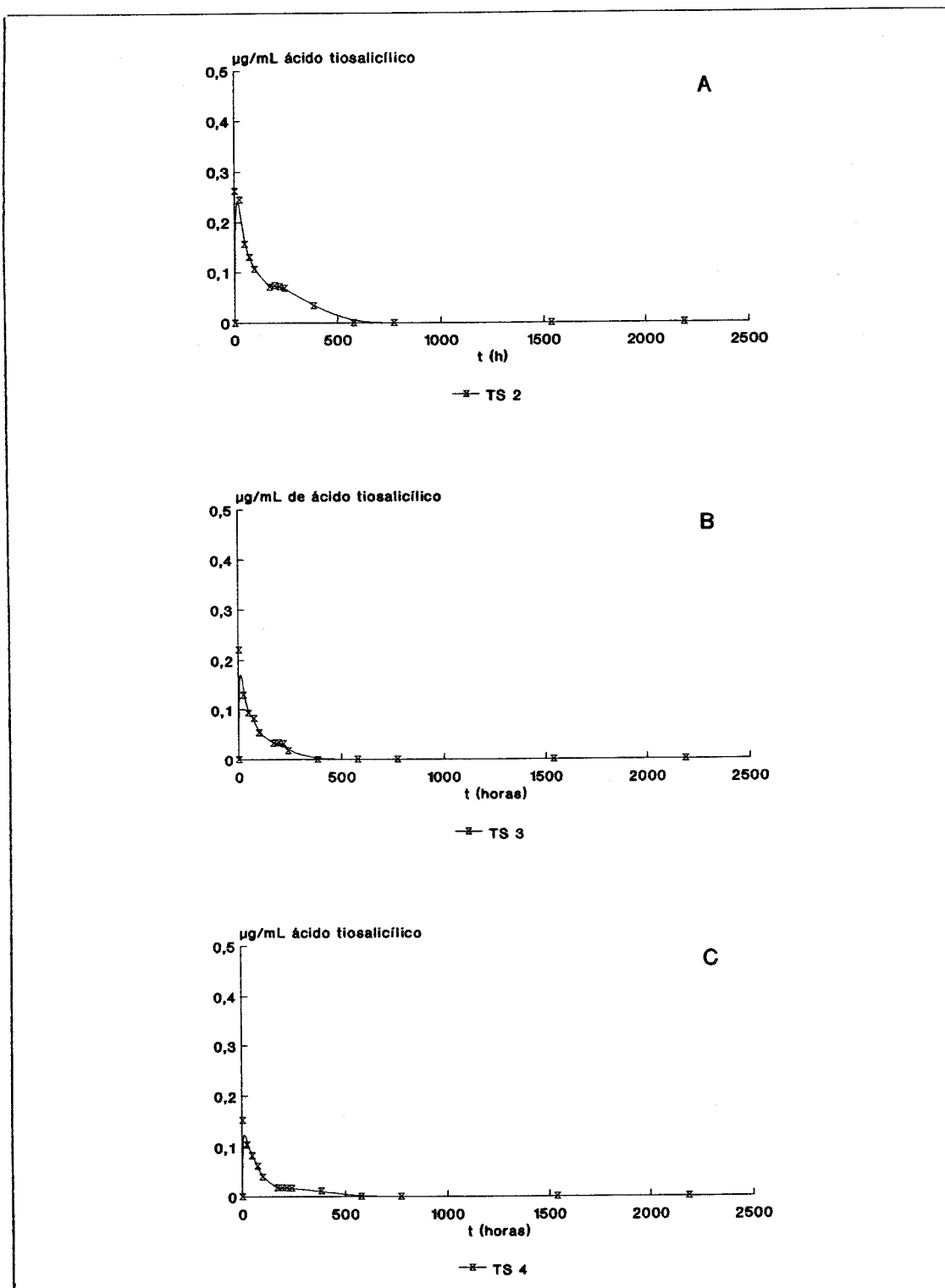


Fig. 7.- Influencia de la fuerza iónica sobre la degradación del ácido tiosalicílico. (A: Sol. 2, B: Sol. 3 C: Sol. 4).

Por otra parte, la influencia que ejerce la fuerza iónica en el tiempo de permanencia de los niveles de ácido tiosalicílico en solución es prácticamente despreciable, ya que en las 3 soluciones se obtienen resultados muy similares.

Todos estos resultados parecen indicar que la influencia que ejercen los niveles de fuerza iónica se manifiestan primordialmente en la cantidad y niveles máximos de ácido tiosalicílico alcanzados, pero no en su tiempo de permanencia.

### 3.2.2.3. En la estabilidad del ácido ditiosalicílico

En la figura 8, se recogen los perfiles del ácido ditiosalicílico remanente en función del tiempo, para las distintas soluciones isotonizadas con cloruro sódico.

Dichas gráficas ponen de manifiesto que no existen grandes diferencias en la formación del ácido ditiosalicílico en función de la distinta fuerza iónica.

Así, mientras en las soluciones 2 y 3, de fuerza iónica elevadas y media respectivamente, se alcanzan niveles máximos de ácido ditiosalicílico de  $0.4 \mu\text{g/mL}$ , en la solución de menor fuerza iónica, solución 4, el valor máximo de ácido ditiosalicílico formado es de  $0.35 \mu\text{g/mL}$ .

Por otra parte, al igual que en el ácido tiosalicílico, se observa claramente como la solución de mayor fuerza iónica, es en la que se produce mayor cantidad de ácido ditiosalicílico y es aquí donde éste se degrada más lentamente.

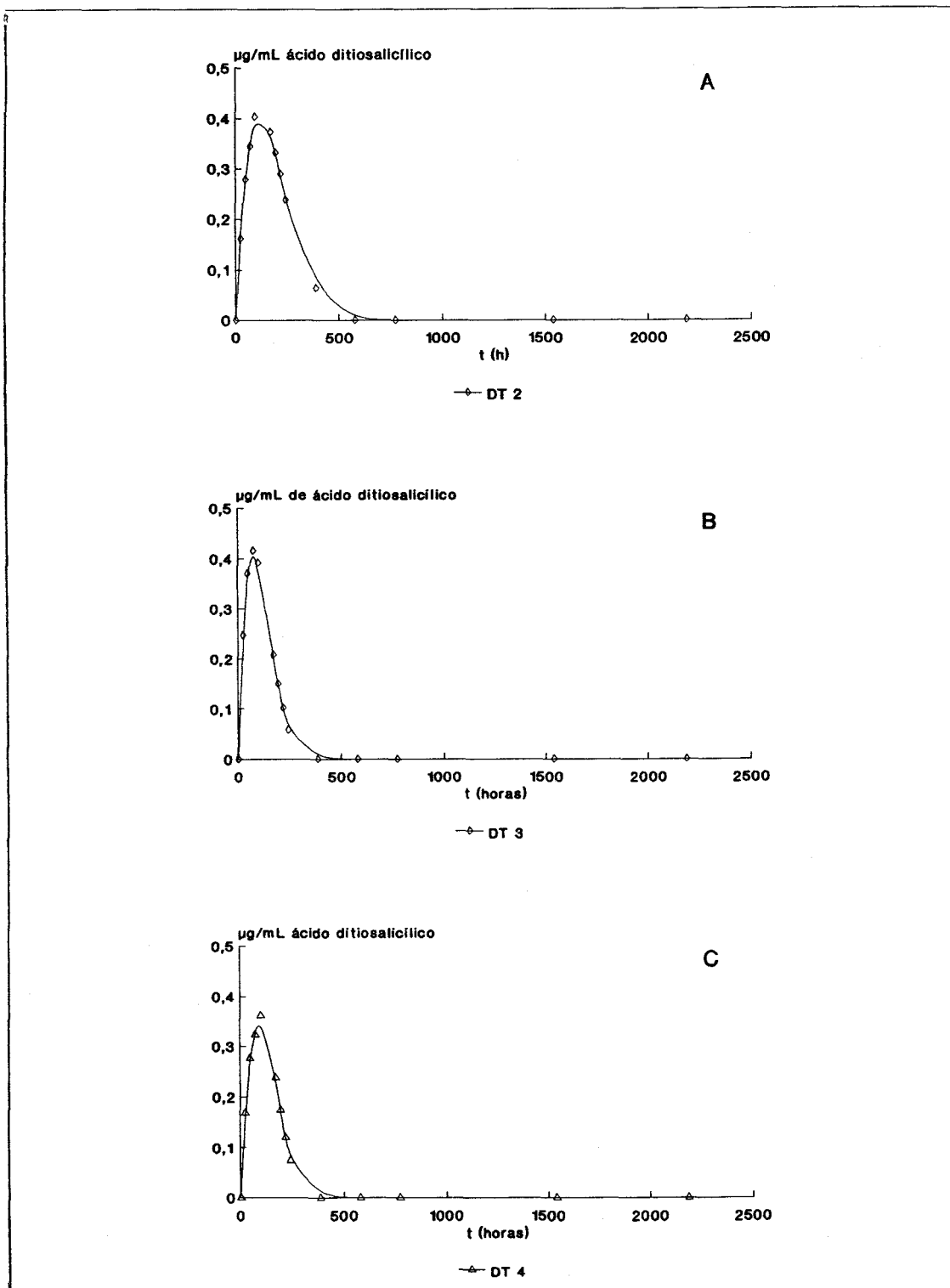


Fig. 8.- Influencia de la fuerza iónica sobre la degradación del ácido ditiosalicílico. (A: Sol. 2, B: Sol. 3 C: Sol. 4).



### 3.3. CINETICAS DE DEGRADACION

Tras una completa revisión de las principales revistas de índice en este área: "*International Pharmaceutical Abstracts*" y "*Chemical Abstracts*", se comprobó que existen muy pocos datos sobre este tema, por lo que decidimos abordar su estudio.

A la hora de abordar el estudio cinético, quisimos poner de manifiesto la influencia del cloruro sódico en el proceso degradativo de estas sustancias, así como el posible efecto protector que la trometamina, pudiera ejercer.

Para ello, estudiamos los niveles de permanencia de los distintos productos (tiomersal, ácido tiosalicílico y ácido ditiosalicílico) en función del tiempo, en cuatro tipos de soluciones: soluciones acuosas, con cloruro sódico al 0.9 %, con trometamina y con cloruro sódico y trometamina.

#### 3.3.1. Tiomersal

Por otra parte, hemos de señalar que el estudio cinético de la degradación del tiomersal ya fue abordado por nuestro grupo de investigación (80), sin poder obtener resultados concluyentes.

Así, en una primera aproximación, sólo pudimos concluir que la degradación del tiomersal no se ajustaba a modelos cinéticos de reacciones sencillas.

Así, y aunque *a priori* éramos conscientes de la dificultad que entrañaba, decidimos ajustar la degradación del tiomersal a otros modelos cinéticos más complejos. Para ello, utilizamos el modelo de la aproximación de la etapa de la velocidad determinante o bien el modelo de la aproximación del estado estacionario,

descritos detalladamente en el apartado de Introducción, con el fin de comprobar si conducían a un buen ajuste.

Desgraciadamente, no fue posible dilucidar con suficiente fiabilidad las constantes de degradación para el tiomersal y sus productos de degradación puesto que los datos no se ajustaron a ninguno de los dos modelos cinéticos citados anteriormente.

Sin embargo, no hay referencias, bibliográfica, sobre las cinéticas de degradación de sus productos de descomposición, los ácidos tiosalicílico y ditiosalicílico, estudio que abordaremos a continuación.

### **3.3.2. Acido tiosalicílico**

Después de obtener los datos de concentración del ácido tiosalicílico en los distintos tiempos y tras aplicar programas de regresión lineal múltiple para el ajuste de funciones matemáticas, correspondientes a los distintos órdenes de reacción, siguiendo las ecuaciones ya expuestas en el apartado de Introducción, pudimos concluir que las soluciones elaboradas con ácido tiosalicílico, inicialmente, se ajustaban todas a una cinética de orden uno. En todas ellas se puede observar los elevados coeficientes de correlación así como los excelentes valores que toma F (tablas 10 a 13).

En las figuras 9 y 10, se recogen las representaciones semilogarítmicas correspondientes a la cinética de degradación del ácido tiosalicílico en medio acuoso, en presencia de cloruro sódico al 0.9 %, en presencia de trometamina y, finalmente, en presencia de trometamina y cloruro sódico en cantidad isotónica. Se representa

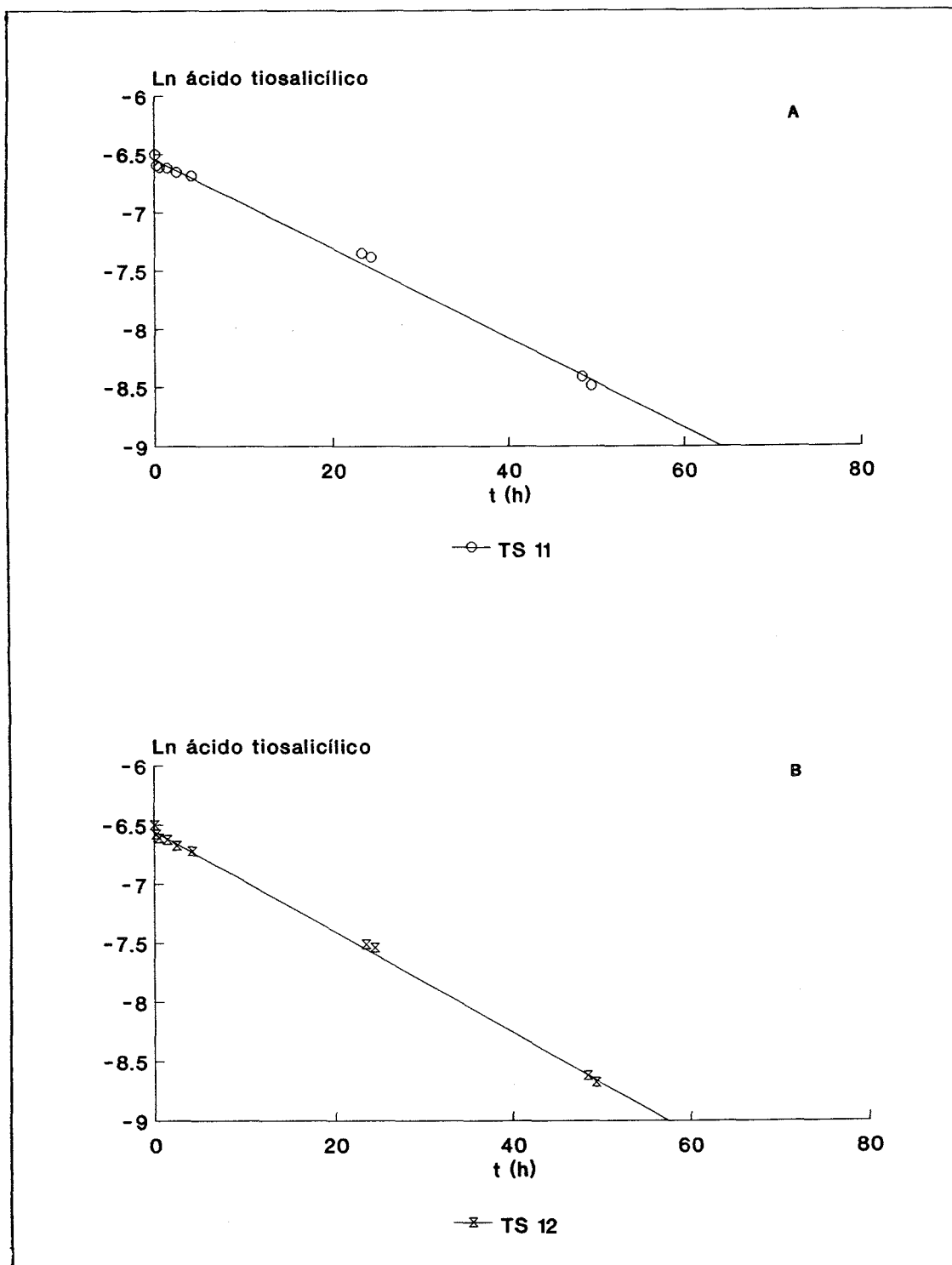


Fig. 9.- Influencia del cloruro sódico sobre la degradación del ácido tiosalicílico. (A: sin isotonizar, B: 0.9 % ClNa).

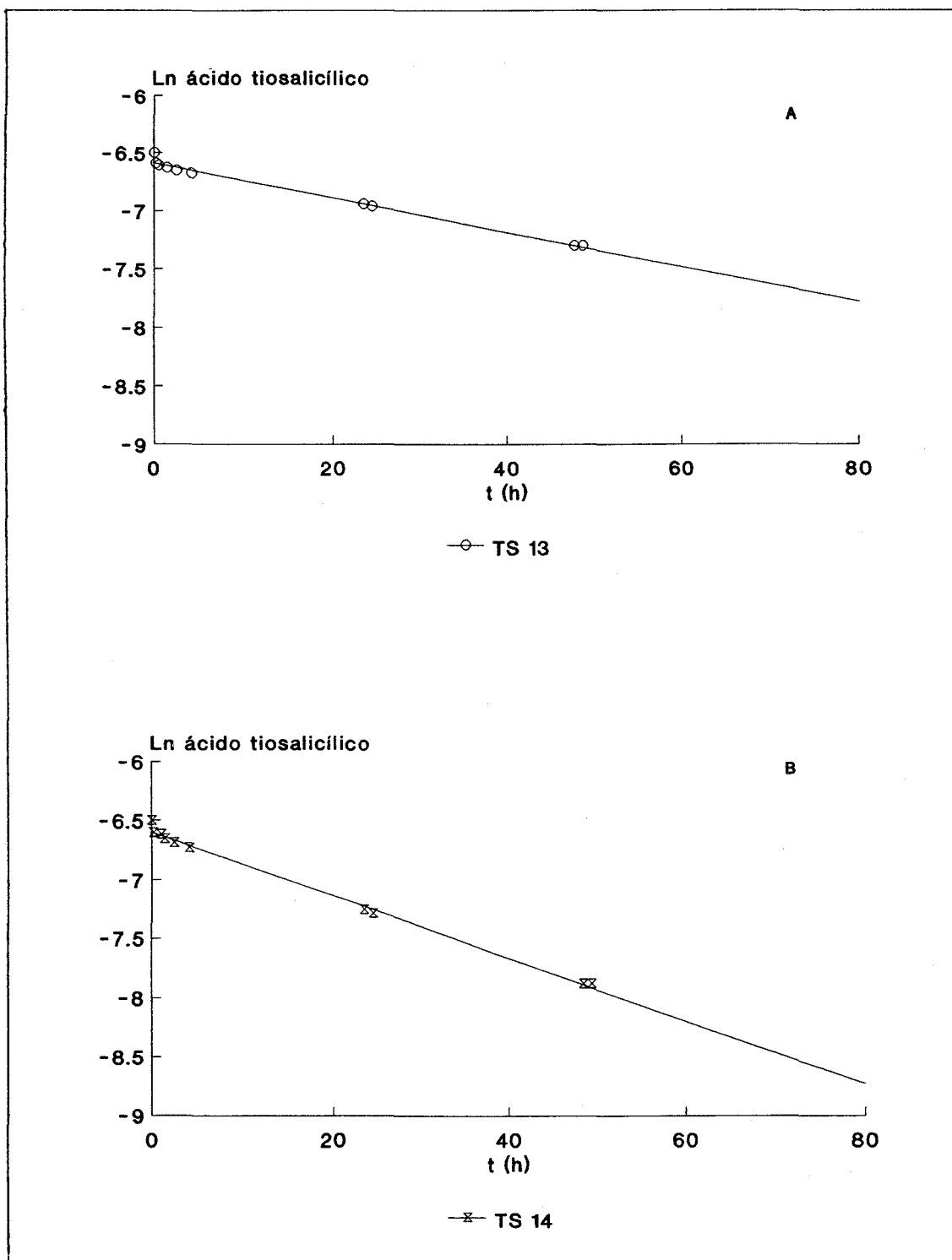


Fig. 10.- Evolución de las soluciones de ácido tiosalicílico con trometamina. (A: sin isotonzar, B: 0.9 % ClNa).

gráficamente el logaritmo neperiano de las concentraciones remanentes de ácido tiosalicílico *versus* tiempo.

A partir de estas rectas de regresión, obtenemos las diferentes constantes de degradación, que lógicamente coincidirán con las pendientes de las rectas obtenidas, y a partir éstas, y según la ecuación  $t_{1/2} = \text{Ln } 2/k$ , calculamos sus semividas químicas, valores que quedan recogidos en la tabla 14.

Coeficiente de determinación : 0.995136		Término independiente : -6.54577			
Coeficiente de correlación : 0.997565		Error estándar : 0.0564217			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	5.21046	5.21046	1636.76	<0.0001
Residuales	8	0.0254672	0.00318340		
Total	9	5.23592			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
-0.0382442	-0.997565	9.453092 10 <sup>-4</sup>	-40.4568	<0.0001	

Tabla 10.- Recta de regresión para la solución elaborada en medio acuoso.

Coeficiente de determinación : 0.998560		Término independiente : -6.55209			
Coeficiente de correlación : 0.999280		Error estándar : 0.0341743			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	6.47765	6.47765	5546.49	<0.0001
Residuales	8	0.00934307	0.00116788		
Total	9	6.48700			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
-0.0426303	-0.999280	5.724134 10 <sup>-4</sup>	-74.4748	<0.0001	

Tabla 11.- Recta de regresión para la solución isotonizada con cloruro sódico.

Coeficiente de determinación : 0.994264		Término independiente : -6.59835			
Coeficiente de correlación : 0.997128		Error estándar : 0.0425858			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	2.51485	2.51485	1386.70	<0.0001
Residuales	8	0.0145084	0.00181355		
Total	9	2.52935			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
-0.266050	-0.997128	7.144522 10 <sup>-4</sup>	-37.2384	<0.0001	

Tabla 12.- Recta de regresión para la solución que contiene trometamina.

Coeficiente de determinación : 0.987445		Término independiente : -6.58956			
Coeficiente de correlación : 0.993703		Error estándar : 0.0347672			
Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Varianza	F	Prob.
Regresión	1	0.760531	0.760531	629.185	<0.0001
Residuales	8	0.00967005	0.00120876		
Total	9	0.770201			
Coef. regresión	Coef. estándar	Error estándar	T	Prob.	
-0.0148247	-0.993703	5.910138 10 <sup>-4</sup>	-25.0836	<0.0001	

Tabla 13.- Recta de regresión para la solución elaborada con cloruro sódico y trometamina.

	Sol. 11	Sol. 12	Sol. 13	Sol. 14
k (h <sup>-1</sup> )	3.82 10 <sup>-2</sup>	4.26 10 <sup>-2</sup>	2.26 10 <sup>-2</sup>	1.48 10 <sup>-2</sup>
t <sub>1/2</sub> (h)	18.14	16.27	26.05	46.82

Tabla 14.- Valores de los parámetros semivida química (t<sub>1/2</sub>) y constante de degradación (k) para las soluciones 11 a la 14.

A pesar que todas estas soluciones presentan una cinética de degradación de orden uno, sin embargo poseen una serie de diferencias entre ellas que se pueden observar en las diferentes semividas para cada solución o bien las distintas constantes de degradación que tienen (vid. tabla 14).

Por otra parte, resulta evidente, como se observa en las figuras 9 y 10, que todas las soluciones muestran una intensa y rápida degradación del ácido tiosalicílico hacia la formación de ácido ditiosalicílico.

### 3.3.2.1. Cinética de degradación en medio acuoso

Los resultados recogidos en la figura 9, ponen de manifiesto el proceso degradativo del ácido tiosalicílico en medio acuoso.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para el tiomersal en dicho medio, ( vid. figura 3), resulta evidente su diferente comportamiento.

Así, mientras el tiomersal en medio acuoso prácticamente no sufre degradación apreciable en el tiempo de duración de nuestro ensayo, siendo imposible calcular ningún valor de constante de degradación, en el caso del ácido tiosalicílico, este proceso está más acentuado, habiéndose podido determinar su constante de degradación  $k = 3.82 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  y tiempo de vida media de 18.14 horas.

### 3.3.2.2. Cinética de degradación con cloruro sódico al 0.9 %

Observando la constante de degradación obtenida (tabla 14), resulta evidente el hecho de que la adición del cloruro sódico prácticamente no produce diferencias significativas en dicha constante, lo que pone de manifiesto que este isotonzante no afecta en gran medida la velocidad de degradación del ácido tiosalicílico (vid. figura 9).

Sin embargo, si comparamos estos resultados con los obtenidos con el producto original, el tiomersal, la influencia del cloruro sódico, sobre el proceso degradativo, es mucho menos acusada en el caso del producto de degradación, ácido tiosalicílico.

La explicación a estos resultados reside en el propio mecanismo de acción propuesto. Así, si recordamos, el anión cloruro ejercía su efecto catalizador de la degradación del tiomersal, debido a su gran afinidad por el mercurio. Si tenemos en



cuenta que este catión no está presente en el ácido tiosalicílico, es lógico suponer que el cloruro sódico ejerce un leve efecto degradativo sobre esta sustancia.

### **3.3.2.3. Cinética de degradación en presencia de trometamina**

Como han señalado algunos autores (81), la trometamina produce un descenso en la velocidad de la reacción de degradación del tiomersal, por lo que ha sido usada como protector en algunas formulaciones del conservante.

Por esto, con el fin de comprobar si esta sustancia puede ejercer también este efecto protector sobre el ácido tiosalicílico, también se incluyeron en nuestro estudio soluciones con trometamina.

Como podemos observar, según los resultados recogidos en la figura 10 y la tabla 14, la adición al medio acuoso de trometamina, supone un efecto beneficioso sobre la estabilidad del ácido tiosalicílico, mucho más acusado que en el caso del tiomersal (80).

En efecto, la acción protectora de este antioxidante se traduce en un descenso en los valores de la constante de degradación y, por tanto, en un incremento en la semivida del producto.

Con estos resultados ponemos en evidencia que la trometamina ejerce una acción protectora sobre esta sustancia en su proceso degradativo, con lo que confirmamos lo propuesto por nuestro grupo de investigación como ya se citó en el apartado de Introducción. Como se puede apreciar en las gráficas, la caída del ácido tiosalicílico en estas soluciones no es tan brusca como en aquellas que no contienen trometamina.

En este sentido, coincidimos con los resultados obtenidos por DOULAKAS (81), quién manifestó un efecto acusado de la trometamina en la estabilidad del tiomersal.

En cuanto al mecanismo por el que esta sustancia ejerce su acción protectora en las soluciones que contienen cloruro sódico, pensamos que se basa en retardar el proceso de dimerización del ácido tiosalicílico, con lo cual se producen menores cantidades de dicho ácido ditiosalicílico que en las soluciones que no contienen trometamol, manteniéndose más elevados los niveles de ácido tiosalicílico.

#### **3.3.2.4. Cinética de degradación con cloruro sódico 0.9 % y trometamina**

Los resultados obtenidos al ensayar esta solución indican una fuerte mejora en la estabilidad del ácido tiosalicílico respecto a la solución elaborada con cloruro sódico, e incluso respecto a la elaborada con trometamina sola (vid. figura 10). Así, las soluciones preparadas con cloruro sódico y trometamina conducen al menor valor de constante de degradación (vid. tabla 14).

Estos resultados refuerzan nuestra conclusión que esta sal, concretamente el ión cloruro, no modifica la velocidad de dimerización de esta sustancia y por lo tanto no afecta a su degradación.

#### **3.3.2.5. Mecanismo de degradación**

Como ya hemos indicado, la degradación del ácido tiosalicílico hacia la formación de un dímero, el ácido ditiosalicílico, es un proceso muy rápido, como se desprende de los datos de semivida química (vid. tabla 14).

Por otra parte, y en cuanto al mecanismo de degradación, proponemos una

reacción a través de radicales libres ya que el grupo sulfhidrilo es muy reactivo y precisamente por este grupo es por donde se produce la reacción de dimerización.

Además, las mejoras en la estabilidad del tiosalicílico conseguidas con la adición de trometamina, refuerza esta hipótesis ya que esta sustancia, al retirar oxígeno del medio, dificultaría la reacción radicalaria de descomposición de esta sustancia.

### **3.3.2.6. Cinética de degradación del ácido ditiosalicílico en presencia del tiosalicílico**

#### **3.3.2.6.1. En medio acuoso**

En la figura 11, recogemos los perfiles del ácido ditiosalicílico remanente en función del tiempo, para la solución tiosalicílico elaborada en medio acuoso.

Resulta evidente como la etapa de formación de dicho ácido, a partir del ácido tiosalicílico presente en el medio, muestra una fuerte pendiente (vid. figura 11). Estos resultados indican que la dimerización del ácido tiosalicílico para dar ditiosalicílico es un proceso muy favorecido.

Así, en un corto espacio de tiempo, se alcanzan los niveles máximos de ácido ditiosalicílico, aproximadamente  $2 \mu\text{g/mL}$ , que se mantienen prácticamente constantes en todo el ensayo.

Estos resultados ponen en evidencia la elevada estabilidad de este producto, al menos en medio acuoso.

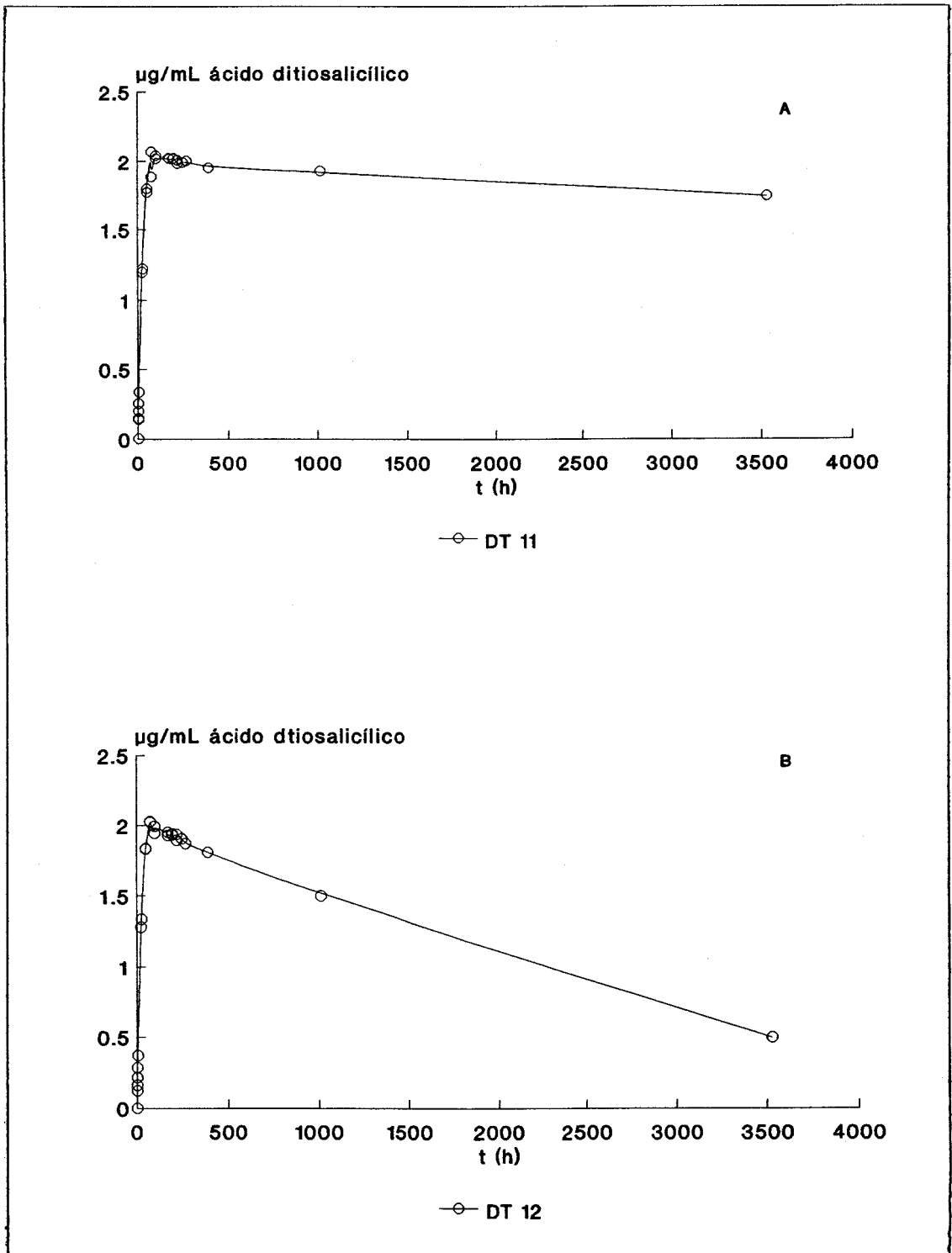


Fig. 11.- Influencia del cloruro sódico sobre la degradación del ácido ditiosalicílico. A: sin isotonizar, B: 0.9 % ClNa

#### 3.3.2.6.2. En presencia de cloruro sódico 0.9 %

En la figura 11, se recoge la evolución de los niveles de ácido remanentes, en una solución isotonicada con cloruro sódico, en función del tiempo.

Aunque la primera etapa de formación es prácticamente idéntica a la descrita en medio acuoso, resulta evidente la mayor inestabilidad del ácido ditiosalicílico en estas soluciones, puesto de manifiesto en la acusada pendiente de la segunda etapa del proceso.

Estos resultados evidencian, el efecto negativo que el ión cloruro ejerce sobre el ácido ditiosalicílico, catalizando su degradación.

#### 3.3.2.6.3. En presencia de trometamina

Según se observa en la figura 12, al adicionar trometamina al medio, la etapa de formación del ácido ditiosalicílico en el medio, se retarda levemente, aunque los niveles máximos alcanzados son muy similares, del orden de 2  $\mu\text{g/mL}$ .

Estos resultados son totalmente lógicos, si tenemos en cuenta el efecto protector que la trometamina ejerce sobre la degradación del ácido tiosalicílico.

#### 3.3.2.6.4. En presencia de cloruro sódico y trometamina

Resulta evidente que en estas soluciones que contienen cloruro sódico, la trometamina disminuye la velocidad de degradación (vid. figura 12), pero tenemos que objetar, en primer lugar, que la descomposición del tiomersal, aunque se produce en menor grado, es más notoria que en las soluciones elaboradas en medio acuoso.

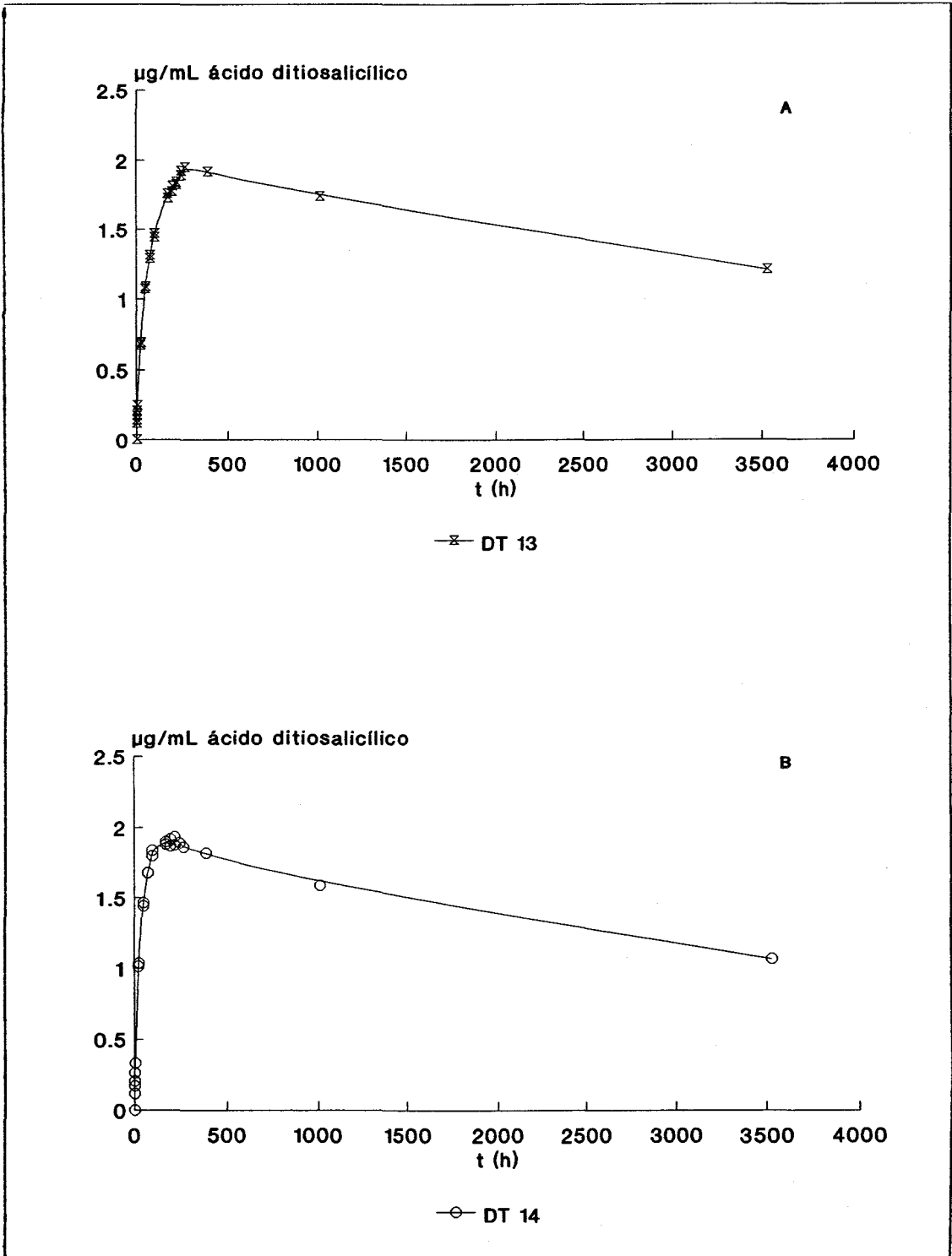


Fig. 12.- Influencia de la trometamina en la degradación del ácido ditiosalicílico. A: sin isotonzar, B: 0.9 % ClNa

Esta circunstancia no puede ser imputable al ión cloruro, ya que los resultados obtenidos son muy similares a los del apartado anterior, en ausencia de dicho ión.

En cuanto al mecanismo por el que esta sustancia ejerce su acción protectora en estas soluciones, pensamos que se basa en retardar el proceso de dimerización del ácido tiosalicílico, con lo cual se producen menores cantidades de ácido ditiosalicílico que en las soluciones que no contienen trometanol, manteniéndose más elevados los niveles de ácido tiosalicílico.

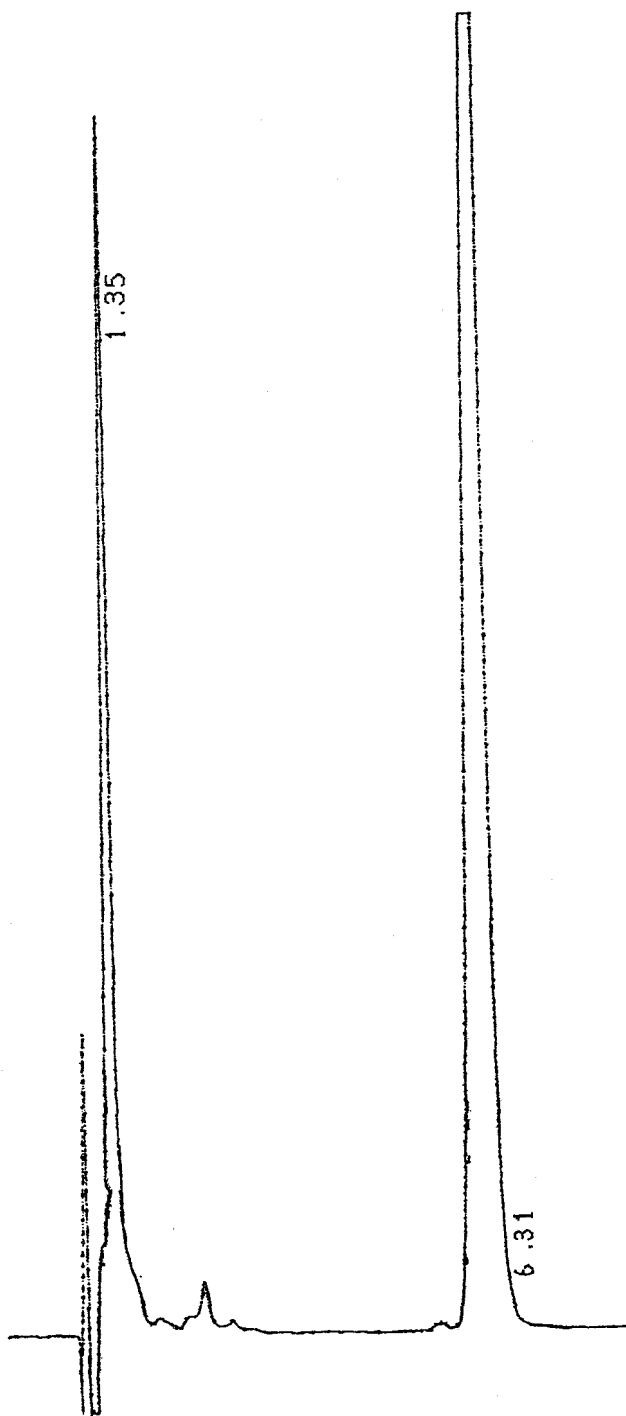
Finalizado este apartado, debemos señalar que no hemos podido determinar la cinética de degradación del ácido ditiosalicílico en las soluciones elaboradas con ácido tiosalicílico ya que, como se indicó en el apartado de Introducción, a la vez que se va formando este dímero, se produce su descomposición.

La existencia de estos productos de degradación se pone de manifiesto al apreciar en los distintos cromatogramas (figura 13) la aparición en el frente del disolvente gran cantidad de picos, de forma similar a como ocurría con el tiomersal.

Hasta el momento no hemos podido determinar su naturaleza, pero su posición en el cromatograma obtenido, nos induce a pensar que son sustancias de bajo peso molecular y de características polares.

### **3.3.3. Cinética de degradación del ácido ditiosalicílico.**

Para este estudio, elaboramos dos soluciones de ácido ditiosalicílico para comprobar si el cloruro sódico afectaba a la degradación de dicho ácido, pero observamos un comportamiento similar en ambos casos, concluyéndose que el cloruro sódico no afecta a la descomposición de dicho ácido.



*Fig 13.- Cromatograma en el que pueden observarse los picos de absorbancia correspondientes a la elución de los productos de degradación del ácido ditiosalicílico (tiempo de retención: 1.35) y del ácido ditiosalicílico (tiempo de retención: 6.31).*



Como en los casos anteriores, después de obtener los datos de concentración del ácido ditiosalicílico en los distintos tiempos y aplicando los programas de regresión lineal múltiple, para el ajuste de funciones matemáticas, correspondientes a los distintos órdenes de reacción siguiendo las ecuaciones ya expuestas en el apartado de Introducción, no pudimos obtener buenos coeficientes de correlación para los órdenes 0, 1 y 2.

### **3.4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

En este apartado tratamos de dilucidar, de una parte, la posible actividad antimicrobiana de los productos de degradación del tiomersal, y por otra, comparar dicha actividad con la propia del tiomersal.

Recordemos que como aparece recogido en la bibliografía, la posible actividad bactericida del ácido tiosalicílico y ditiosalicílico, podría compensar en cierto modo la pérdida de actividad de las soluciones de tiomersal tras su degradación.

#### **3.4.1. Confirmación de la actividad antimicrobiana del tiomersal.**

Este estudio fue realizado con el fin de poner de manifiesto la actividad antimicrobiana del tiomersal frente a las distintas Enterobacterias seleccionadas. Para ello, dichos microorganismos fueron sembrados en placas cuyos medios de cultivo contenían un 0.002 % y 0.001 % de tiomersal.

Elegimos estas dos concentraciones de tiomersal puesto que son las que normalmente se utilizan en las soluciones comerciales para la limpieza y desinfección de las lentes de contacto.

Después de un período de incubación de 16 horas a 37 °C, se pudo observar que no existía ningún tipo de crecimiento bacteriano, evidenciando así la actividad antimicrobiana del tiomersal frente a todas las bacterias ensayadas.

### 3.4.2. Estudio comparado

Para realizar este estudio, empleamos discos impregnados de soluciones de los productos al 0.001 y 0.002 %, como se explica más detalladamente en el apartado de material y métodos de la presente Memoria.

Los resultados obtenidos tras un período de incubación de 16 horas a 37 °C, se recogen en las figuras 14 a 18.

Dichos resultados confirman la actividad antimicrobiana que ejerce el tiomersal, independientemente de la concentración y tipo de Enterobacteria ensayada, puesta de manifiesto por halos de inhibición del crecimiento bien marcados.

Por otra parte, y en contra de la opinión ampliamente recogida en la bibliografía (73), sus productos de degradación, los ácidos tiosalicílico y ditiosalicílico, no muestran efecto antimicrobiano apreciable, al menos en las concentraciones ensayadas.

Podemos concluir, por tanto, que la actividad bactericida de las soluciones de tiomersal, son debidas exclusivamente a este producto y en ningún modo pueden ser atribuidas a sus productos de degradación.

	E. c.	S. m.	S. a.	P. a.	P. m.
TM					
0.001 (g)	+	+	+	+	+
0.002 (g)	+	+	+	+	+
TS					
0.002 (g)	-	-	-	-	-
0.001 (g)	-	-	-	-	-
DT					
0.001 (g)	-	-	-	-	-
0.002 (g)	-	-	-	-	-

*E. c.:* *Escherichia coli*

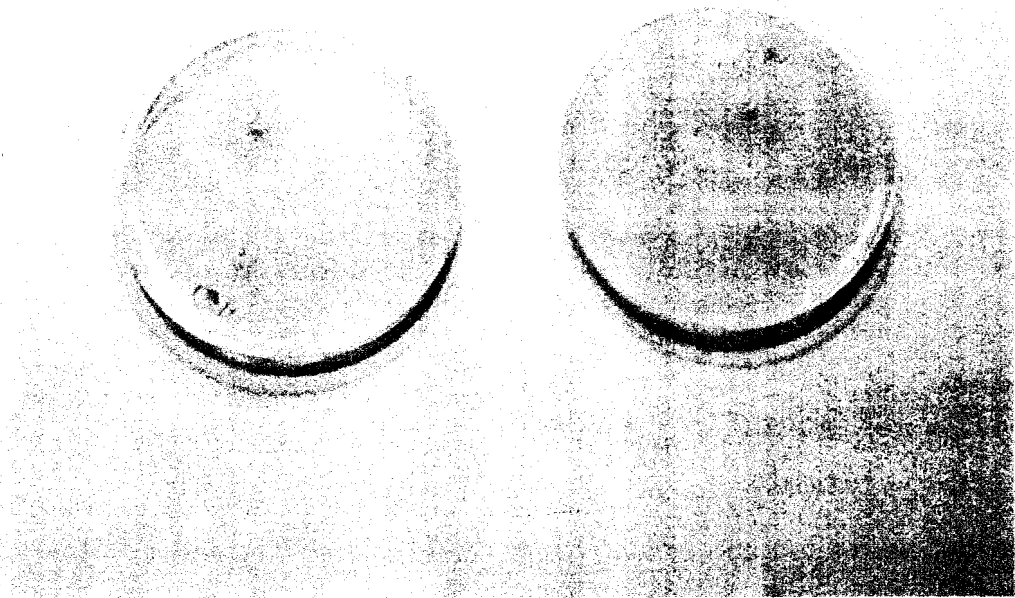
*S. m.:* *Serratia marcescens*

*S. a.:* *Staphylococcus aureus*

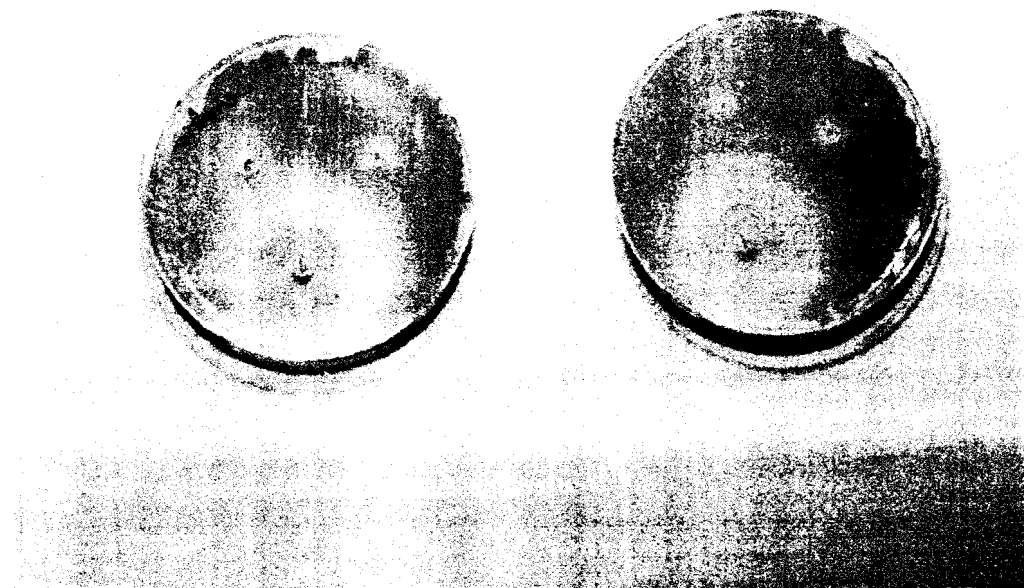
*P. a.:* *Pseudomonas aeruginosa*

*P. m.:* *Proteus mirabilis*

Tabla 15.- Actividad antimicrobiana de TM (tiomersal), TS (ácido tiosalicílico) y DT (ácido ditiosalicílico) frente a las distintas Enterobacterias.



*Fig. 14.- Cultivo microbiano en medio sólido de Escherichia coli.*



*Fig 15.- Cultivo microbiano en medio sólido de Serratia marcescens.*

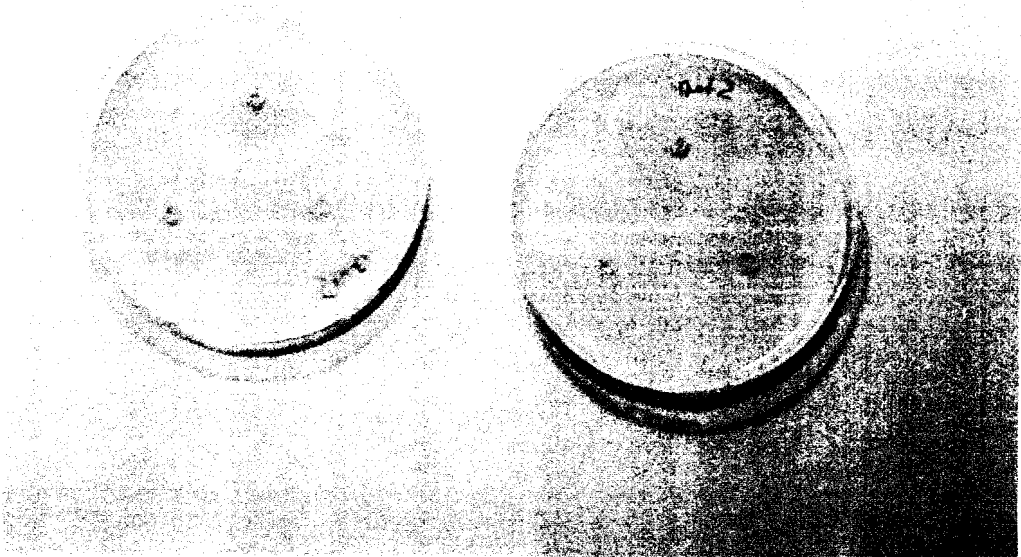


Fig 16.- Cultivo microbiano en medio sólido de *Staphylococcus aureus*.

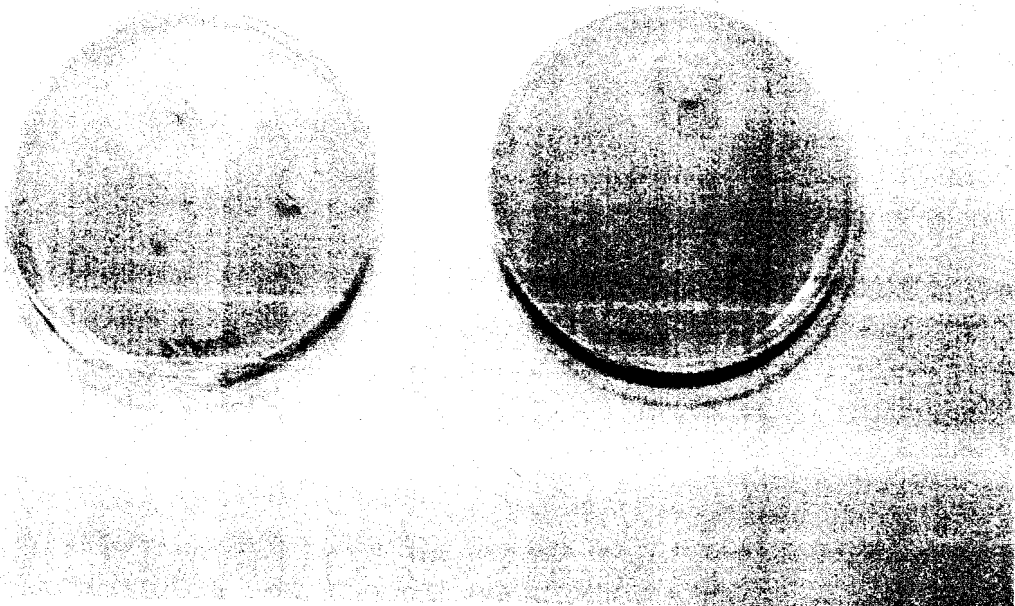
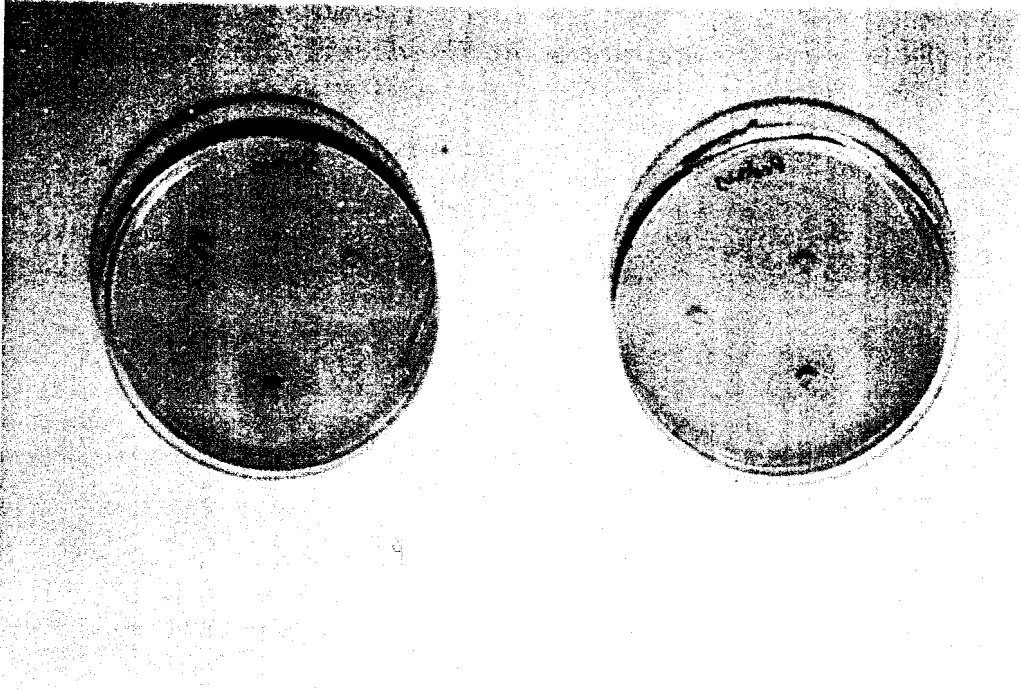


Fig 17.- Cultivo microbiano en medio sólido de *Pseudomonas aeruginosa*.



*Fig 18.- Cultivo microbiano en medio sólido de Proteus mirabilis.*

**CONCLUSIONES**



1. Al estudiar la influencia del tipo de isotonzante sobre la estabilidad del tiomersal, hemos puesto de manifiesto que, a diferencia del cloruro sódico, el nitrato sódico y el fosfato sódico dibásico no afectan decisivamente en su degradación.

2. En el caso de las soluciones isotonzadas con cloruro sódico, existe una relación directa entre los valores de fuerza iónica y la velocidad de degradación del tiomersal; sin embargo, cuando el isotonzante empleado es el nitrato sódico o el fosfato sódico dibásico, la fuerza iónica no ejerce efecto apreciable en la descomposición de este conservante.

3. De los resultados anteriores se concluye que el principal responsable en la degradación del tiomersal es el ión cloruro debido a su afinidad por el mercurio.

4. Los estudios de estabilidad efectuados sobre el tiomersal en soluciones de cloruro sódico con distintos valores de fuerza iónica, muestran que a medida que aumenta este parámetro, disminuyen la cantidad y niveles máximos de ácido tiosalicílico, producto primario procedente de la degradación del tiomersal.

5. Aunque los valores de fuerza iónica, prácticamente no ejercen influencia sobre la formación del ácido tiosalicílico, sí manifiestan un marcado efecto en su velocidad de degradación, obteniéndose una relación inversa entre ambos parámetros.

6. Los estudios cinéticos efectuados muestran que la degradación del ácido tiosalicílico en todas las soluciones estudiadas se ajusta a una cinética de orden uno.

7. Estos resultados pusieron de manifiesto que, mientras que los niveles de cloruro sódico no afectan significativamente a la descomposición del ácido tiosalicílico, la adición de trometamina consigue disminuir notablemente su velocidad de degradación.

8. Tras la aplicación de las ecuaciones correspondientes, se ha podido evidenciar que la degradación del ácido ditiosalicílico no se ajusta a los modelos cinéticos sencillos.

9. Los estudios microbiológicos pusieron de manifiesto la actividad antimicrobiana del tiomersal a concentraciones del 0.001 % y 0.002 %. Por otra parte, sus productos de degradación, el ácido tiosalicílico y ditiosalicílico, no mostraron efecto bactericida apreciable.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- J.E.F. REYNOLDS (Editor)  
"Martindale. The Extra Pharmacopoeia", 29th edit.  
The Pharmaceutical Press, London, 1989, p. 970
- 2.- M. WINDHOLZ (Editor)  
"The Merck Index", 10th edit.  
Merck & Co., Rahway, 1983, p. 1334
- 3.- A.R. GENNARO (Compilador General)  
"Remington. Farmacia", 17<sup>a</sup> edic.  
Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires, 1987, p. 1587
- 4.- P. MATHIEU  
"Essais de classification et formulation générale des collyres"  
Sci. Tech. Pharm., **8**, (6), 287 - 293 (1979).
- 5.- G.L. CURETON, N.C. HALL  
"The separate functions of cleaning and sterilizing soft contact lenses"  
Amer. J. Optom. & Physiol. Optics, **51**, (6), 406 - 413 (1974).
- 6.- J. SPITTLER, C. BROUILLARD, A. STAMM  
"Manufacturing of tablets designed to obtain a cleaning/disinfecting and storage  
solution for contact lenses"  
Drug Dev. Ind. Pharm., **14**, (4), 523 - 536 (1988).
- 7.- O.H. DABEZIES  
"Contact lens hygiene: past, present and future"  
Second International Medical Contact Lens Symposium  
and XXI International Congress of Ophthalmology  
Ciudad de México, 6 - 7 Marzo 1970.
- 8.- "Handbook of Pharmaceutical Excipients"  
The Pharmaceutical Press, London, 1986, p. 325

- 9.- British Pharmacopeia, 14th rev.  
London, 1988, p. 568
- 10.- The United States Pharmacopeia, 22nd rev.  
Rockville, 1990, p. 1361
- 11.- N.E. RICHARDSON, D.J.G. DAVIES, B.J. MEAKIN, D.A. NORTON  
"The interaction of preservatives with polyhydroxyethyl-metacrylate  
(polyHEMA)"  
J. Pharm. Pharmac., **30**, 469 - 475 (1978).
- 12.- A. DÄRR  
"Tecnología Farmacéutica"  
Acribia, Zaragoza, 1981, p. 277
- 13.- A.H. BATTS, C. MARRIOT, G.P. MARTIN, C.F. WOOD, S.W. BOND  
"The effect of some preservatives used in nasal preparations on the mucus and  
ciliary components of the mucociliary clearance"  
J. Pharm. Pharmacol., **42**, (3), 145 - 151 (1990).
- 14.- A.H. BATTS, C. MARRIOT, G.P. MARTIN, S.W. BOND, J.L. GREAVES,  
C.G. WILSON  
"The use of a radiolabelled saccharin solution to monitor the effect of the  
preservatives thiomersal, benzalkonium chloride and EDTA on human nasal  
clearance"  
J. Pharm. Pharmacol., **43**, (3), 180 - 185 (1991).
- 15.- W.A.J.J. HERMENS, F.W.H.M. MERKUS  
"The influence of drugs on nasal ciliary movement"  
Pharm. Res., **4**, (6), 445 - 449 (1987).
- 16.- J.L. HONIGMAN  
Pharm. J., **2**, 253 (1975) de J.E.F. REYNOLDS, loc. cit. (2), p. 970

- 17.- E.M. SALONEN, A. VAHERI, T. TERVO, R. BEUERMAN  
"Toxicity of ingredients in artificial tears and ophthalmic drugs in a cell attachment and spreading test"  
J. Toxicol. Cutan. Ocul. Toxicol., **10**, (1 - 2), 157 - 166 (1991) a través de Current Contents (2640200).
- 18.- S. KILVINGTON, Y. ANTHONY, D.J.G. DAVIES B.J. MEAKIN  
"Effect of contact lens disinfectants against Acanthamoeba cyst"  
Rev. Infect. Dis., **13**, (5 suppl), 414 - 415 (1991) a través de Current Contents (2545267).
- 19.- J. JORDANO  
"Farmacología ocular" Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.  
Pamplona, Septiembre 1985.
- 20.- I. NOEL, A. GALLOWAY, F.A. IVE  
"Hipersensitivity to thiomersal in hepatitis B vaccine"  
Lancet, **338**, 705 (1991) a través de Int. Pharm. Abst. (2900976).
- 21.- M.M. ANDERSEN, T. RONNE  
"Side-effects with Japanese encephalitis vaccine"  
Lancet, **337**, 1044 (1991) a través de Int. Pharm. Abst. (2808543).
- 22.- MASON et al.  
Clin. Toxicol. **4**, 185 (1971), de M. WINDHOLZ, loc. cit. (3), p. 1334
- 23.- G.M. VOLGAREVA  
"Study of the damaging action of two chemical contaminants of vaccines on chromosomes, carried out in mice"  
Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., **4**, 41 - 45 (1991) a través de Current Contents (2619426).
- 24.- J. LORES, H. TORRIANI, S. LAMDAN  
"Farmaco-química I"  
Eudeba, Buenos Aires, 1976, p. 67

- 25.- J.L.S. BURSON, A.M. RABASCO  
"Estudios de estabilidad de medicamentos"  
Ind. Farm., 1, (6), 37 - 41 (1986).
- 26.- R. FRANQUESA, V. ALMIRALL, S. ALSINA, J.L. ALVAREZ, M.C.  
TOMAS  
"Estabilidad de medicamentos"  
Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Sant Hipolit de Voltregá,  
1985, p. 176
- 27.- Loc. cit. (26), p. 177
- 28.- I.N. LEVINE  
"Físico-química", 3ª edic.  
McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1991, p. 600
- 29.- P.W. ATKINS  
"Físicoquímica", 3ª edic.  
Addison - Wesley Iberoamericana S.A., Wilmington, 1986, p. 815
- 30.- Loc. cit. (29), p. 805
- 31.- B.H. MAHAN  
"Química. Curso universitario", 3ª edic.  
Fondo Educativo Interamericano, S.A., Reading, 1977, p. 354
- 32.- A.T. FLORENCE, D. ATTWOOD  
"Physicochemical Principles of Pharmacy", 2nd edit.  
The MacMillan Press, Hong Kong, 1988, p. 90
- 33.- H.E. AVERY  
"Cinética Química básica y mecanismos de reacción"  
Reverté S.A., Barcelona, 1977, p. 11
- 34.- Loc. cit. (29), p. 807

- 35.- P.W. ATKINS  
"Physical Chemistry", 2nd edit.  
Oxford University Press, London, 1983, p. 931
- 36.- R.S. BERRY, S.A. RICE, J. ROSS  
"Physical Chemistry"  
John Wiley & Sons, New York, 1980, p. 1120
- 37.- Loc. cit. (26), p. 179
- 38.- G.W. CASTELLAN  
"Físico Química", 2ª edic.  
Fondo Educativo Interamericano, Ciudad de México, 1976, p. 722
- 39.- I.N. LEVINE  
"Físico-química"  
McGraw-Hill Co., México, 1981, p. 352
- 40.- Loc. cit. (29), p. 813
- 41.- Loc. cit. (39), p. 354
- 42.- B. STEVENS  
"Cinética Química"  
Bellaterra, Barcelona, 1973, p. 84
- 43.- Loc. cit. (26), p. 190
- 44.- R.E. WESTON, A. SCHWARZ  
"Cinética Química"  
Alhambra, Madrid, 1976, p. 21
- 45.- Loc. cit. (32), p. 99
- 46.- Loc. cit. (38), p. 735



- 47.- Loc. cit. (26), p. 193
- 48.- Loc. cit. (28), p.p. 622 - 623
- 49.- Loc. cit. (29), p.p. 822 - 823
- 50.- R.A. ALBERTY  
"Physical Chemistry", 7th edit.  
John Wiley & Sons, 1987, U.S.A., p. 251
- 51.- Loc. cit. (38), p. 360
- 52.- Loc. cit. (28), p. 302
- 53.- Loc. cit. (28), p. 303
- 54.- G.M. BARROW  
"Química Física", 4ª edic.  
Reverté, Barcelona, 1985, p. 713
- 55.- Loc. cit. (33), p. 111
- 56.- A. RIGGIN, D. CLODFELTER, A. MALONEY, E. RICKARD, E. MASSEY  
"Solution stability of the monoclonal antibody-vinca alkaloid conjugate"  
Pharm. Res., **8**, 1264 - 1269 (1991) a través de Int. Pharm. Abst. (2903804).
- 57.- K.E. OGGER, C. NOORY, J. GABAY, V.P. SHAH, J.P. SKELLY  
"Dissolution profiles of resin-based oral suspensions"  
Pharm. Tech., **15** (1991) a través de Int. Pharm. Abst. (2902117).
- 58.- R. MARTINEZ-PACHECO, J.L. VILA-JATO, J.L. GOMEZ-AMOZA  
"Effects of different factors on stability of ceftriaxone in solution"  
Farmaco Ed. Prat., **42**, (5), 131 - 137 (1987).

59.- Y. PRAMAR, V.D. GUPTA

"Preformulation studies of spironolactone: effect of pH, two buffer species, ionic strength and temperature on stability"

J. Pharm. Sci., **80**, (6), 551 - 553 (1991).

60.- Loc. cit. (38), p. 365

61.- Loc. cit. (50), p. 253

62.- Loc. cit. (29), p. 272

63.- Loc. cit. (33), p. 116

64.- Loc. cit. (28), p. 325

65.- Loc. cit. (38), p. 370

66.- Loc. cit. (29), p.p. 280 - 281

67.- R. POHLOUDEK-FABINI, E. MARTIN

"Einfluß der Gaspermeabilität von Kunststoffen auf die stabilität des thiomersals"

Pharmazie, **36**, (10), 683 - 685 (1981).

68.- R.J. PINNEY

"The disinfection of contact lenses" (Comunicación)

Interdisciplinary Conference on Contact Lenses, London, 24 - 25 Junio 1976.

69.- S. STORPIRTIS, E. BERTINI, L. CLOHS, N. VENTURA, V.M. BORGES,  
T. SAITO

"Avaliação da eficácia antimicrobiana de soluções para lentes de contacto"

Rev. Farm. Bioquim. Univ., **22**, (2), 87 - 96 (1986).

70.- M.J. READER, C.B. LINES

"Descomposition of thimerosal in aqueous solution and its determination by High-Performance Liquid Chromatography"

J. Pharm. Sci., **72**, (12), 1406 - 1409 (1983).

71.- M.J. READER

"Influence of isotonic agents on the stability of thimerosal in ophthalmic formulations"

J. Pharm. Sci., **73**, (6), 840 - 841 (1984).

72.- K. THOMA, O.E. SCHUBERT

"Thiomersal. Wie chemisch instabil ist dieses Konservierungsmittel?"

Dtsch. Apoth. Ztg., **127**, (38), 1867 - 1869 (1987).

73.- K. HOWORKA, B. HOWORKA

"Preservation of iodide eye drops"

Pharm. Ztg., **125**, (3), 562 - 563 (1980).

A través de Int. Pharm. Abst., **17**, (18), 987 (1980).

74.- J.S. FLEITMAN, I.W. PARTRIDGE

"Thimerosal analysis in ketorolac tromethamine ophthalmic solution. Comparing HPLC and colorimetric techniques"

Drug Dev. Ind. Pharm., **17**, (4), 519 - 530 (1991).

75.- W. STOCK, U. KLAUS

"Question of the preservation of potassium iodide eye drops with thiomersal"

Pharm. Ztg., **127**, (4), 733 - 736 (1982).

A través de Int. Pharm. Abst., **20**, (14), 1246 (1983).

76.- I. CARABALLO, A.M. RABASCO

"Problemática actual del tiomersal en soluciones para lentes de contacto"

Ind. Pharm. (en prensa)

77.- I. CARABALLO, A.M. RABASCO, M. FERNANDEZ-AREVALO

"Study of thimerosal degradation mechanism"

Int. J. Pharm., **89**, 213 - 221 (1993).

78.- A.M. RABASCO, I. CARABALLO, M. FERNANDEZ-AREVALO

"Formulation factors affecting thimerosal stability"

Drug Dev. Ind. Pharm., **19**, (4), 1673 - 1691 (1993).

- 79.- I. CARABALLO, M. FERNANDEZ-AREVALO, M.A. HOLGADO, M.J. ARIAS, A.M. RABASCO  
"Mecanismo de descomposición del tiomersal en soluciones acuosas. Efecto de la adición de trometamina"  
Libro de Resúmenes. Primera Reunión Científica de la Asociación de Docentes de Farmacia Galénica, Madrid, 25 de Septiembre 1992, p. 275 - 276
- 80.- I. CARABALLO  
"Estudio de la cinética de degradación del tiomersal en preparados farmacéuticos"  
Tesis de Licenciatura, Universidad de Sevilla, 1991.
- 81.- J. DOULAKAS  
"Amino polyol stabilization of mercury-containing preservative in eye drops"  
Ger. Offen. DE 3.612.538  
A través de Chem. Abst., **108**, 368 (1988).
- 82.- A.M. RABASCO, I. CARABALLO, M.J. PEREZ-BARRALES  
"Influencia del pH en la cinética de degradación del tiomersal"  
VIII Jornadas Farmacéuticas Españolas, Sevilla, 3 - 6 Diciembre 1991.
- 83.- N.E. RICHARDSON, D.J.G. DAVIES, B.J. MEAKIN, D.A. NORTON  
"Loss of antibacterial preservatives from contact lens solutions during storage"  
J. Pharm. Pharmacol., **29**, 717 - 722 (1977).
- 84.- W.E. DIVER  
"Química y tecnología de los plásticos"  
Litton Educational Publishing, Ciudad de México, 1982, p. 49
- 85.- G. KÜHNE  
"Envases y embalajes de plástico"  
Gustavo Gili, Barcelona, 1976, p. 21

86.- C.P. CROCE, A. SISCHER, R.H. THOMAS

"Packaging material science" en "The theory and practice of Industrial  
Pharmacy", 3rd edit. (Edit.: L. LACHMAN, L. LIEBERMAN, J.L. KANIG)  
Lea & Febiger, Philadelphia, 1986, p. 718

87.- Loc. cit. (80), p. 106