

DETERMINACION DE LAS FRACCIONES:
SALICILICO (ACIDO SALICILICO LIBRE +
CONJUGADO) Y ESTER SALICILICO
DE LA ORINA, LUEGO DE LA INGESTION
DE ACIDO ACETILSALICILICO

LUIS ROLANDO SUÁREZ *

RESUMEN

Se describen una serie de modificaciones al método de Peters que permiten dosificar el ácido salicílico (libre + conjugado) y el esterificado. El método que se propone para el ácido salicílico esterificado, se caracteriza por la sencillez de su ejecución. Se tabulan las determinaciones realizadas en la orina de tres personas que han ingerido ácido acetilsalicílico.

Consultando diversos autores que tratan el tema de "Vías de eliminación del ácido acetyl salicílico", hemos encontrado discrepancias respecto de los porcentajes asignados en la excreción urinaria de los distintos compuestos que resultan de su metabolismo.

Martin Groos y León A. Greenberg, en su "Critical Bibliographic Review", respecto de "The Salicylates" (1), indican que: "Los esteres salicílicos son ampliamente hidrolizados en el tracto gastrointestinal o después de su absorción, liberándose el grupo salicílico como tal".

Además, una pequeña cantidad de los esteres ingeridos pueden aparecer en la sangre y sugieren que no está claramente definido que

* Jefe de Sección del Instituto de Investigación Libre y Asesoramiento, Montevideo; con la colaboración de la Br. Sra. Viviane Grass de Carran.

una pequeña porción pueda aparecer en la orina sin hidrolizarse. Del salicílico liberado o ingerido como tal, aproximadamente un 75 % se excreta por la orina como compuesto que contiene grupos salicílicos intactos y el resto presumiblemente es destruido por oxidación con formación de ácido gentísico y otros productos de oxidación. De la cantidad total del salicílico eliminado, aproximadamente la mitad está presente como ácido salicílico, una cuarta parte conjugado al ácido sulfúrico o glicurónico y una cuarta parte como ácido salicílico libre.

Lister Lolly y Greenberg determinaron, en 1946, "el cociente horario de excreción del salicilato en la orina luego de la administración de 0.98 gr. de ácido acétil salicílico en sujetos normales". Determinaron que la excreción fue virtualmente completa a las veinte horas de administrado y cuando la dosis ingerida de ácido acétil salicílico era de 0.33 ó 1.95 gr., la eliminación se hacía prácticamente total a las 15 y a las 30 horas respectivamente.

T. Sollman (2) indica que "el ácido acétil salicílico se descompone en parte desde que llega al estómago, aunque se hidroliza en una mayor proporción en el intestino y se absorbe una fracción íntegra".

Velázquez (3) expresa que "el ácido acétil salicílico administrado por vía gástrica se elimina por la orina en un 40 % como tal, y el resto en su mayor parte como ácido salicílico".

Con estos datos tan contradictorios nos pareció interesante verificar los porcentajes eliminados por la orina de las fracciones: ácido salicílico libre y conjugado y del ácido salicílico esterificado.

Pero necesariamente para realizar esta contribución se requería previamente adoptar una técnica que nos permitiera determinar dichas fracciones con un determinado grado de exactitud.

Para la determinación del salicilato en los flúidos biológicos y en los tejidos se han seguido dos métodos generales, uno hidrovolumétrico y otro colorimétrico. El primero se basa en que los componentes fenólicos pueden ser bromados y por lo tanto la cantidad de bromo consumida da una medida de los fenólos presentes. Como frecuentemente los flúidos biológicos tienen compuestos fenólicos además de salicilatos, los autores indican para determinarlos, separarlos previamente por extracción con disolventes orgánicos ó mediante destilación al vapor.

El método bromométrico es menos sensible que el colorimétrico y requiere por lo tanto muestras grandes de material.

El colorimétrico puede ser siempre usado y se basa en la reacción del ácido salicílico con el cloruro o nitrato férrico dando lugar a la formación de un compuesto de color violeta en soluciones extremadamente diluidas.

Martin Gross y León Greenberg, en su revista bibliográfica ya citada, indican que: "Es preferible separar los salicilatos de los líquidos o tejidos donde se determinan por extracción o destilación dado que pueden existir sustancias (fénolos, citratos, oxalatos, fosfatos) que interfieren en la coloración con las sales Fe^{+++} ". Sin embargo, nosotros hemos verificado, en las condiciones que más adelante se detallan, que los oxalatos y fosfatos existentes normalmente en 0.1 de ml. de orina no molestan en su reacción con las sales férricas. Por otra parte, si existieran compuestos fenólicos, éstos por regla general también son solubles en los disolventes orgánicos y no se separarían por extracción.

De las técnicas clásicas colorimétricas por extracción citamos las siguientes:

La de Herissey (Soc. Biol., 1922) que separa el ácido salicílico con éter y trata directamente el disolvente con solución acuosa de $FeCl_3$, evapora después el éter y hace dosificación colorimétrica en el residuo resultante utilizando una escala conocida.

Pellet y Grober dosifican el ácido salicílico en los vinos, agotando con benceno, separan la mitad del volumen de éste y agregan solución diluida de $FeCl_3$. Luego hacen titulación colorimétrica colocando en un tubo la misma cantidad de reactivo férrico y solución tipo de ácido salicílico hasta tener igual coloración.

W. Ayala (4) aplica la técnica indicada por Pellet y Grober pero usa para la apreciación colorimétrica el comparador de Hellige. Denigés (5) propone agotar la orina con éter en medio sulfúrico, separar luego dicho disolvente, filtrarlo y evaporarlo y finalmente trata el residuo con solución reactivo a base de $FeCl_3$.

Como se ve, todas estas técnicas colorimétricas son bastante similares y de ellas inicialmente ensayamos la indicada por Denigés.

Al ensayar esta técnica observamos que era larga y engorrosa por la emulsión que tiende a formar la orina cuando se agita con el disolvente. La conclusión que sacamos después de efectuar muchos

ensayos colorimétricos al filtrofotómetro, fue que era poco práctica y con tendencia a dar resultados bajos de acuerdo con las experiencias de control que hemos realizado.

Consultando la fuente bibliográfica del Chemical Abstracts hemos encontrado posteriormente que se han propuesto otro tipo de técnicas más prácticas y más sencillas que no hacen extracción previa del ácido salicílico, sino que se opera sobre la orina misma y que usan en lugar de escala, colorímetro de Dubosq y comparador de Hellige, o el filtrofotómetro como nosotros habíamos hecho inicialmente al ensayar la técnica indicada por Denigés.

Otro aspecto que nos llamó la atención al iniciar esta contribución fue que en todos los tratados y revistas consultadas que tratan la determinación de compuestos salicílicos en la orina, los autores se limitan a dar técnicas para dosificar el ácido salicílico libre y conjugado pero no dan detalles para determinar la fracción esterificada.

Pero consultando un trabajo de J. H. Smith (6), referente a la "determinación de la concentración total de salicilato en el plasma luego de la administración de pequeñas dosis de ácido acetyl salicílico" se indica la técnica siguiente: "Agregar 0.5 ml. de NaOH 1.5 N a 4 ml. del líquido bicarbonatado de extracción en un tubo de ensayo Pyrex y colocar en un baño de agua a ebullición 15', sacar y enfriar. Agregar reactivo de Folin Ciocalteu (a base de sales de molibdeno y tungsteno) y NaOH y medir la densidad óptica como antes".

Por otra parte, de las técnicas que usan directamente la orina—sin extracción previa—adoptamos la de Johan Peters (7) luego de ensayarla por ser práctica y suficientemente exacta.

Esta técnica la hemos completado pues además de dosificar el ácido salicílico como indica el autor, determinamos también el esterificado por diferencia entre el total previa hidrólisis y el libre hallado directamente. Para esto, hemos aplicado a la orina las modificaciones dadas por Smith para la dosificación de la concentración total del salicilato en el plasma o sea lo referente al uso de NaOH 1.5 N durante 15' al B. M. en ebullición.

Inicialmente verificamos al ensayar la técnica de J. Peters que los oxalatos y fosfatos existentes en 0.1 de ml. de orina que es la toma en vol. que utilizamos, no molestan en la reacción de los salicilatos con las sales férricas.

En esta contribución hemos establecido los detalles de la técnica después de estudiar la influencia de diversos factores, para determinar el salicílico esterificado y que grado de exactitud se logra al determinar ambas formas, salicílico libre y conjugado y salicílico esterificado mediante experiencias de control.

Hemos logrado así nuestro propósito:

- 1º) Establecer una técnica sencilla y rápida para determinar ambas fracciones por separado, controlando la exactitud lograda.
- 2º) Establecer la técnica correcta, verificar los porcentajes de eliminación del ácido salicílico (libre + conjugado) y del esterificado luego de la ingestión del ácido acetyl salicílico.

I) FUNDAMENTO DE LA DETERMINACION

Se basa, como dijimos, en la reacción de coloración que da el salicílico con las sales Fe^{+++} determinando la densidad óptica de la solución en un filtro-fotómetro y con el dato obtenido se halla la cantidad de ácido salicílico correspondiente en la curva standard de trabajo.

Para determinar el salicílico esterificado nos hemos basado en los hechos siguientes:

- a) Que los esteres de ácido salicílico no dan reacción coloreada con las sales Fe^{+++} .
- b) Que los álcalis diluidos lo desdoblan en caliente dando salicilatos de sodio que reaccionan con el reactivo férrico.

A continuación se indica en:

II) Preparación de la curva standard, los detalles seguidos, comprendiendo además el estudio del tiempo de conservación del reactivo férrico y ensayos de curvas usando orinas normales y agua destilada.

En III) Estudio de la influencia de la reacción sobre el compuesto coloreado base de la dosificación.

En IV) se dan detalles de la técnica adoptada para la hidrólisis del ácido acetyl salicílico y verificación de la exactitud lograda.

En V) se expone la técnica que hemos adoptado para dosificar el ácido salicílico libre y el esterificado.

En VI) se dan indicaciones de las experiencias efectuadas al dosificar en la orina de tres personas que han ingerido ácido acetil salicílico durante las 24 horas siguientes a su administración. Además se establecen las curvas de eliminación y finalmente se detallan las conclusiones que hemos deducido.

II) PREPARACION DE LA CURVA STANDARD

a) Hemos hecho tres series, de seis tubos cada una, con orinas de tres personas que no habían ingerido ácido acetil salicílico. En cada una de las tres series, se puso 0.1 de ml. de orina. En una cuarta serie se puso 0.1 de ml. de agua destilada en lugar del volumen correspondiente de orina.

b) A todos los tubos se les agrega 1 ml. de solución de ClNa 1.5 N porque al hacer la hidrólisis con NaOH 1.5 N para la determinación del salicílico esterificado y posterior neutralización, se origina una cantidad de ClNa equivalente, anulándose así la influencia que tiene esta sustancia respecto de la reacción coloreada base de la dosificación.

c) A cada tubo y en forma ordenada se les agrega, de solución tipo de salicilato de sodio que tiene 0.5797 g. % equivalente a 0.500 g. % en ácido salicílico, los volúmenes siguientes: 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 ml.

d) A cada tubo se le agrega 0.3 ml. de reactivo férrico. Este reactivo se obtiene según la técnica de Peters, pesando 5 g. de nitrato férrico, agregando 2 ml. de ácido nítrico concentrado y agua cantidad suficiente para 100 ml.

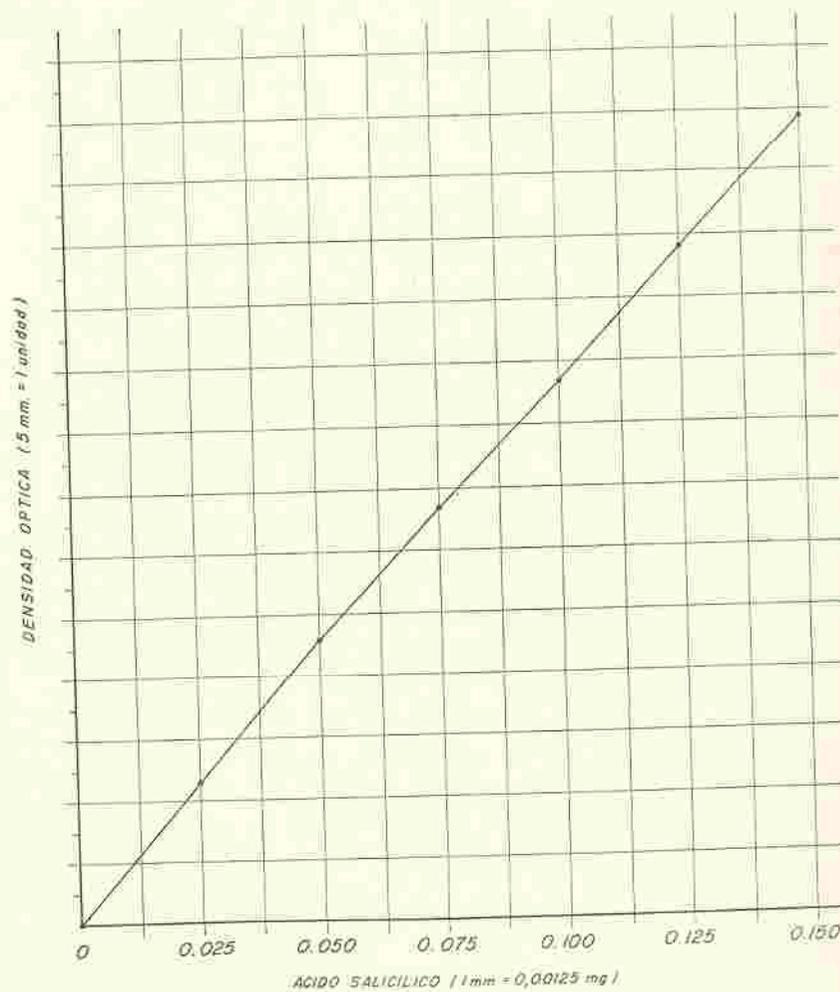
Nota: Hemos observado que el reactivo Fe^{+++} no debe tener más de cuatro días, pues, a pesar de que en su composición tiene NO_3H libre, igualmente se altera coloreándose y por consiguiente las lecturas al filtro-fotómetro resultan erróneas.

e) Finalmente se completa en cada tubo a un volumen de 8 ml.

f) La lectura al filtro-fotómetro se hace después de los cinco minutos de efectuada la reacción, que es el tiempo mínimo para la estabilización del color. Pero éste se mantiene dentro de las 24 horas, pues hemos verificado que las lecturas no varían de un día para el otro.

Se adjunta el cuadro con los valores promedios obtenidos.

DENSIDAD OPTICA DEL ACIDO SALICILICO



Densidades ópticas multiplicadas por 10			
Tubos	mg. de ácido salicílico puesto	Promedio de 8 determinaciones usando 0.1 ml. de orina	Usando 0.1 ml. de agua
1	0.025	4.7	4.6
2	0.050	9.3	9.3
3	0.075	13.4	13.4
4	0.100	17.6	17.5
5	0.125	21.7	21.7
6	0.150	25.4	25.8

Como se puede apreciar, los valores promedios de las densidades ópticas obtenidas usando 0.1 ml. de orina concuerdan prácticamente con las del agua. Por lo tanto, para los cálculos de la dosificación del ácido salicílico en una orina se puede usar indistintamente una u otra curva.

Nosotros hemos adoptado la curva con los datos obtenidos con 0.1 ml. de H₂O destilada.

De acuerdo con los límites de transmisión aconsejados por los autores Kolthoff y Sandell (8), convendría operar con tomas cuyas transmisiones están entre 10 y 70 % equivalente en densidad entre 0.2 y 1 para el caso de que los cálculos se hicieren en base a la proporcionalidad entre concentración y densidad. Pero como nosotros hemos construido una curva standard de trabajo, podemos ampliar los límites correspondientes obteniendo resultados igualmente satisfactorios.

III) ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA REACCION SOBRE EL COMPUESTO COLOREADO BASE DE LA DOSIFICACION

Para la dosificación del salicílico esterificado, es necesario:

- Efectuar la hidrólisis con solución de hidróxido de sodio 1.5 N en tubo cerrado, al bañomaria durante 15 minutos según la técnica de Smith indicada anteriormente.
- Enfriar y neutralizar el medio alcalino, de lo contrario, al agregar el reactivo férrico precipitará hidróxido férrico y no tendrá lugar la formación del compuesto de color violáceo con el ácido salicílico.

Al comienzo de nuestras experiencias, luego de enfriar agregábamos una cantidad de HCl 1.5 N equivalente a la solución de NaOH usada, de acuerdo con el ensayo de neutralización que hacemos aparte entre el HCl y la NaOH. Pero los datos obtenidos en las pruebas de control no eran exactos. Posteriormente hemos determinado que esos errores se debían a los diferentes valores de pH resultantes en los tubos de hidrólisis y que eran motivados en parte porque algo de NaOH era consumido por diversas sustancias existentes en la orina durante la hidrólisis en caliente del ácido salicílico esterificado.

Efectuamos de expreso una experiencia, poniéndonos en condiciones extremas de pH ácido y alcalino, antes de agregar el reactivo férrico, para apreciar así la influencia errónea que tenía en los resultados obtenidos. Hemos verificado que, agregando el reactivo férrico sobre el agua que tiene 0.05 ml. de NaOH 1.5 N, la reacción del medio resultante se hace francamente ácida (pH 2 a 3), lo que es explicable si se tiene en cuenta que las sales Fe⁺⁺⁺ sufren hidrólisis y además porque en la preparación de dicho reactivo se ha agregado NO₂H.

Se adjunta el cuadro con los datos obtenidos de tres series partiendo de 0.1 ml. de orina a la que se agrega cantidades conocidas de ácido salicílico y 1 ml. de ClNa 1.5 N en la primera serie. En la segunda, se le agrega, además, 0.05 ml. de HCl 1.5 N y en la tercera en lugar de HCl, 0.05 ml. de NaOH 1.5 N. Luego a las tres se les agrega 0.3 ml. del reactivo Fe⁺⁺⁺ y agua destilada cantidad suficiente para 8 ml.

Tubos	mg. de ácido salicílico agregados	mg. de ácido salicílico hallados		
		1ra. serie	2da. serie	3ra. serie
1	0.025	0.025	0.021	0.041
2	0.050	0.050	0.041	0.064
3	0.075	0.074	0.064	0.094
4	0.100	0.101	0.098	0.125
5	0.125	0.125	0.109	0.138

De acuerdo con los datos obtenidos, se observa que en la primera serie, que no tiene ácido ni álcali, los resultados son satisfactorios, mientras que si la reacción con el reactivo Fe⁺⁺⁺ se hace en un medio que tiene 0.05 ml. de NaOH 1.5 N, se producen errores francamente positivos y son apreciablemente negativos si el medio inicialmente es ácido (0.05 ml. en exceso de HCl 1.5 N).

Por la experiencia realizada se deduce que no conviene que el medio sea inicialmente alcalino, por la influencia que tiene el OH^- respecto del equilibrio de disociación del $(\text{NO}_3)_2\text{Fe}$, que al favorecer la reacción de hidrólisis, hace que la solución Fe^{+++} presente color y por lo tanto el dato obtenido de la densidad del complejo férrico salicilado se vea aumentado por ese motivo. Este error también se produce a pesar de que el medio se haga ácido, pero no lo suficiente como para mantener la concentración del Fe^{+++} en las condiciones de reacción requeridas.

Por las mismas razones, pero en sentido inverso, no conviene que la acidez inicial sea tan elevada, pues ésta se suma a la del reactivo y por lo tanto la concentración del Fe^{+++} no será suficiente para que en presencia del ion salicílico se efectúe la reacción total.

Por esto resolvimos hacer nuevas experiencias usando un elemento que nos acusara la reacción y elegimos como más práctico el uso de un indicador coloreado cuya zona de viraje fuera alcalino a los efectos de que acuse fácilmente una ligera acidez y que este medio no tenga color. Uno de los indicadores que llena estas condiciones es la fenoltaleína. Previamente hicimos pruebas en blanco a los efectos de determinar si el indicador que es un derivado fenólico del ácido ftálico podría dar lugar a ser una causa de error (mala conservación) al intervenir en la reacción de las sales Fe^{+++} pero por las pruebas realizadas comprobamos que no se producía tal error.

La prueba se realizó de la siguiente manera:

En 5 tubos se puso: 0.1 ml. de orina en cada tubo y cantidades que oscilaban entre 0.025 y 0.125 mg. de salicilato de Na expresado en ácido salicílico. Luego a todos, 4 a 5 ml. de agua destilada y 1 gota de solución alcohólica de fenoltaleína al 1%. En seguida se dejó caer mediante un tubo gotero NaOH 0.3 N hasta rosado y se hizo retorno con HCl 0.3 N hasta incoloro.

Los resultados obtenidos son:

Tubos	mg. de ácido salicílico agregados	mg. de ácido salicílico hallados	E. R. %
1	0.025	0.025	0
2	0.050	0.049	2
3	0.075	0.075	0
4	0.100	0.101	1
5	0.125	0.128	2.4

De acuerdo con los datos, se observa que operando en medio ácido, se obtienen resultados concordantes a los asignados con un error relativo que va del 0.0 al 2.4%. Esta conclusión está bastante de acuerdo con lo indicado por Allport (9) que establece que la intensidad óptima del color violeta corresponde a un medio de acidez mineral de 0.005 N, mientras que en nuestro caso teniendo un exceso de 1 gota de HCl 0.3 N (0.05 ml.) para un volumen final de 8 ml. corresponde a una acidez mineral de 0.002 N.

IV) TECNICA ADOPTADA PARA LA HIDROLISIS DEL ACIDO ACETIL SALICILICO

- En cada tubo se pone 0.1 ml. de orina de persona que no ha ingerido medicamento salicilado (nota 1).
- Se agrega cantidades conocidas de ácido salicílico y acetil salicílico mediante la medida de volúmenes de soluciones tipo (nota 2).
- Se agrega a cada uno 0.5 ml. de solución de NaOH 1.5 N, se tapan y se someten a bañomaría 15 minutos (nota 3).
- Se enfrían y se les agrega a cada uno 3 a 4 ml. de agua destilada.
- Luego, una gota de solución reactivo de fenoltaleína e inmediatamente se deja caer HCl 1.5 N hasta viraje, y se lleva al rosado tenue mediante el agregado de NaOH 0.3 N de a gotas. Finalmente con una gota de HCl 0.3 N se hace el viraje al incoloro.

NOTAS

- Las medidas de orina, de las soluciones tipo de salicilato de sodio, de ácido acetil salicílico y del reactivo Fe^{+++} , se hacen con microburetas de 2 ml. verificadas antes y graduadas al centésimo de mililitro.
- a) Se utilizaron los volúmenes a 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 ml. (en tubos numerados del 1 al 5) de solución acuosa de salicilato de sodio 0.5797 g.%.
b) Se utilizaron los siguientes volúmenes: 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 y 0.50 ml. (que se agregaron a los tubos anteriores 1, 2, 3, 4 y 5) de solución de ácido acetil salicílico conteniendo 0.050 g.% disolviéndolo previamente en 25 ml. de alcohol rectificado y llevándolo con agua hasta el litro. Esta solución se conserva 24 horas, lo que hemos verificado mediante lecturas en el fotocolorímetro en presencia del reactivo Fe^{+++} . Después de las 24 horas comienza a alterarse como consecuencia de la hidrólisis, liberando ácido salicílico y acusando por lo tanto D. óptica.
- Como no disponíamos de tubos con tapón de esmeril, hicimos soldar en tubos Pyrex (11 x 1.5 cm.), en la boca de los mismos, dos ganchitos diametralmente opuestos, a los efectos de sujetar el tapón de corcho mediante bandas finas de goma.

f) Se agrega 0.3 ml. de reactivo férrico y agua cantidad suficiente para 8 ml. (nota 4).

g) Simultáneamente se hace una prueba en blanco a los efectos de establecer el 0 del aparato utilizando 0.1 ml. de H₂O destilada en lugar de orina y luego procediendo exactamente igual que en la técnica propuesta.

h) Hemos utilizado, para efectuar esta contribución, un fotocolorímetro "EEL" (10) provisto de una escala cuyas lecturas dan directamente las D. ópticas multiplicadas por 10.

De acuerdo con las indicaciones dadas por el fabricante para la elección correcta del filtro, hemos procedido de la siguiente manera:

Se operó con dos tomas de salicilato de sodio que, expresadas en ácido salicílico corresponden a 0.05 y 0.10 mg., se agregó 0.3 ml. de reactivo Fe⁺⁺⁺ y 1 ml. de ClNa 1.5 N completando con agua destilada a 8 ml. Se determinó el 0 mediante una prueba en blanco formada por los reactivos indicados (sin salicilato de sodio).

Las lecturas obtenidas fueron:

		mg. de ácido salicílico	
		0.05	0.10
Filtro	verde OGB1	8.9	17.8
	rojo ORI	3.5	6.9
	azul OB2	8.3	17.0

De acuerdo con las lecturas obtenidas, los filtros verde y rojo están prácticamente en las relaciones de sus concentraciones, pero de ellos elegimos el verde dado que acusa una mayor densidad para la misma concentración, lo que es ventajoso desde el punto de vista de la exactitud deseada.

Verificación de la exactitud de la técnica adoptada.

Se han hecho todas las experiencias por duplicado, como se ha establecido anteriormente.

Datos prácticos:

4) A los efectos de no tener necesidad de calcular el agua que se debe agregar, consideramos más práctico hacer marcas en cada tubo correspondiente al volumen de 8 ml.

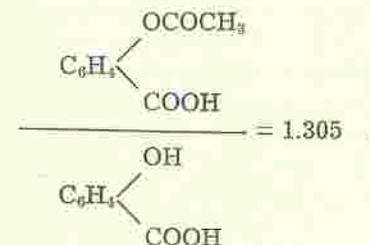
Antes de la hidrólisis:

Promedio de lecturas obtenidas (separación ± 2%)	mg. de ácido salicílico libre hallado	mg. de ácido salicílico existente	E. R. %
4.5	0.025	0.025	0.0
9.0	0.049	0.050	2.0
13.1	0.074	0.075	1.3
17.1	0.099	0.100	1.0
21.4	0.124	0.125	0.8

Luego de la hidrólisis:

Promedio de lecturas obtenidas (separación ± 2%)	mg. de ácido salicílico total hallado	mg. de ácido salicílico prov. hidrólisis	mg. de ácido acétil salicílico corresp.	mg. de ácido salicílico existente	E. R. %
5.2	0.029	0.004	0.005	0.005	0.0
10.4	0.056	0.007	0.009	0.010	10.0
15.2	0.086	0.012	0.016	0.015	6.7
20.0	0.115	0.016	0.021	0.020	5.0
24.6	0.143	0.019	0.025	0.025	0.0

* Estos valores se deducen de los datos obtenidos haciendo la diferencia entre los mg. de ácido salicílico total (luego de la hidrólisis) y los mg. de ácido salicílico libre (antes de la hidrólisis). Para transformar los datos obtenidos de salicílico en ácido acétil salicílico, se multiplican por el factor de transformación correspondiente



V) TECNICA PROPUESTA PARA LA DOSIFICACION DEL ACIDO SALICILICO LIBRE Y ESTERIFICADO EN LA ORINA

Para determinar el 0 del aparato, se utiliza la orina de la misma persona, que se recoge antes de ingerir el ácido acetil salicílico. Hemos efectuado las experiencias tomando 1 g. de ácido acetil salicílico oficial sin ácido salicílico libre y recogiendo la orina que se va produciendo a la hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 16 horas y 24 horas y se miden los volúmenes correspondientes.

a) Dosificación del ácido salicílico libre en la orina.

Técnica: 0.1 ml. de orina + 1 ml. de ClNa 1.5 N + 0.3 ml. de reactivo Fe^{+++} y agua destilada cantidad suficiente para 8 ml. (se hacen experiencias por duplicado). Se realizan las lecturas de la densidad óptica con una diferenciación entre sí, de un $\pm 2\%$ y se determinan en la curva standard, la cantidad correspondiente de ácido salicílico. Se multiplica por 10 para determinar la cantidad correspondiente a 1 ml. de orina, ya que se trabaja con 0.1 ml. y finalmente por el volumen en ml. correspondiente a lo eliminado para tener así las cantidades excretadas en los tiempos referidos.

b) Dosificación del ácido salicílico esterificado en la orina.

Técnica: 0.1 ml. de orina de la persona que se recoge antes de ingerir el ácido acetil salicílico para determinar el 0 del aparato y 0.1 ml. de orina correspondiente a las horas establecidas. A esas tomas se les agrega 0.5 ml. de NaOH 1.5 N y se llevan al baño María a ebullición en tubo cerrado durante 15 minutos. Luego se enfría, se agrega 3 a 4 ml. de agua destilada y una gota de fenolftaleína. Se neutraliza mediante el agregado, de a gota, de HCl 1.5 N hasta decoloración y se lleva luego al rosado pálido con NaOH 0.3 N, finalmente con HCl 0.3 N se deja caer de a gota hasta que vire al incoloro. Se agrega 0.3 ml. de reactivo Fe^{+++} y agua cantidad suficiente para 8 ml.

Se determina el 0 del aparato con el ensayo en blanco y luego se hacen las lecturas de las densidades ópticas correspondientes a las horas establecidas.

Se determina en la curva standard la cantidad de ácido salicílico existente después de la hidrólisis o sea el total. A este valor se le resta el ácido salicílico libre. Se tiene así el quantum proveniente de la hidrólisis.

Luego se multiplica esa cantidad:

- por el coeficiente de transformación 1.305 y
- por 10 y por el volumen en ml. de orina eliminada obteniéndose el ácido acetil salicílico eliminado como ester.

VI) EXPERIENCIAS

Se han hecho varias experiencias con orinas de personas que han ingerido 1 g. de ácido acetil salicílico puro (se ha controlado que las orinas no tenían salicílico antes de la ingestión de dicho compuesto). Estas experiencias han sido hechas en una misma época del año (invierno), corresponden a personas de diferentes edades con regímenes alimenticios diferentes, pero manteniéndose el mismo para cada una de ellas.

Estas determinaciones se han realizado dentro de las 24 horas siguientes a la recolección de las muestras de orina.

Nota: Si la orina es turbia por la cristalización de ácidos o sales, lo que sucede cuando la temperatura ambiente es baja, se debe calentar ligeramente a los efectos de volverla limpia.

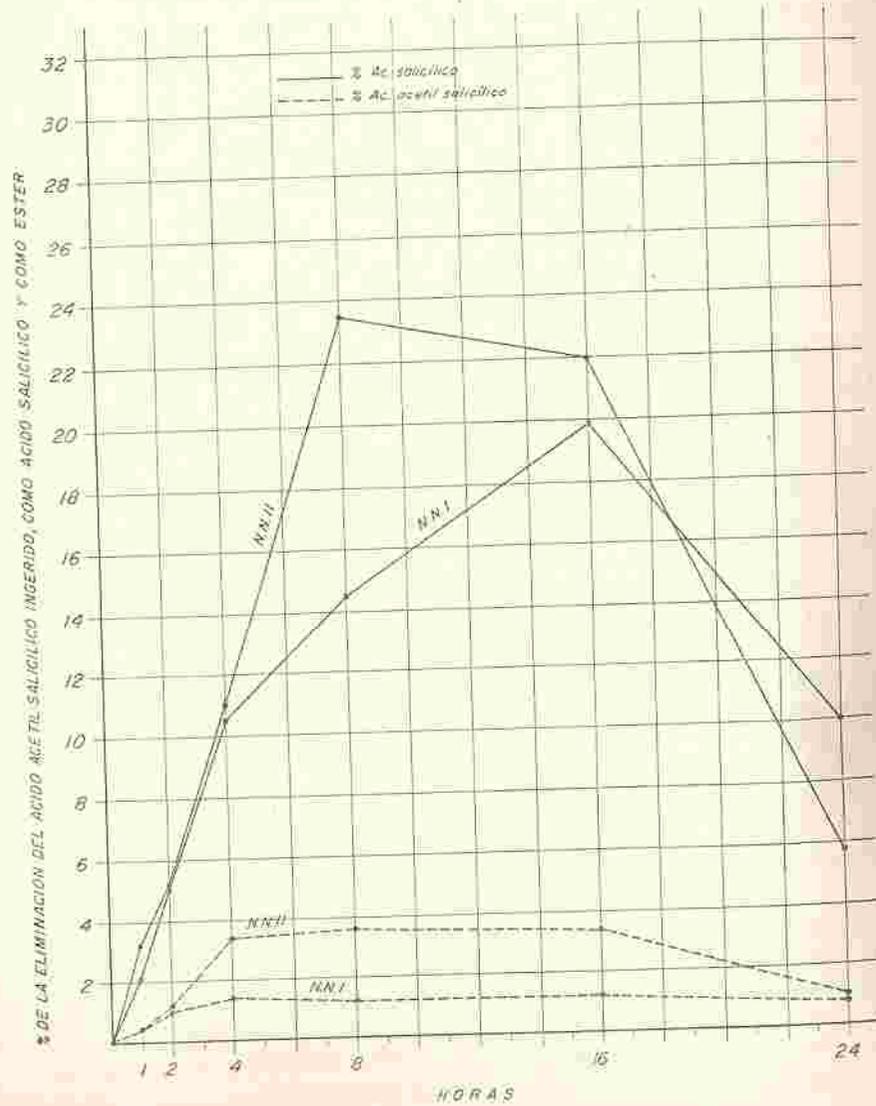
En el siguiente cuadro se expresan los porcentajes eliminados de ácido salicílico libre y esterificado con respecto al ácido acetil salicílico ingerido.

Según los datos prácticos obtenidos en nuestro trabajo, ingiriendo vía bucal 1 g. de ácido acetil salicílico, se elimina por la orina en 24 horas:

- de un 60 % a un 70 % como ácido salicílico,
- y de un 7 % a un 13 % como ester.

Gráfica 2

DENSIDAD OPTICA DEL ACIDO SALICILICO



Tiempo transcurrido para la recolección de orina luego de ingerir 1 g. de ácido acetil salic. equiv. a 0,766 g. de ácido salic.	N. N.	Volumen en ml. de orina	mg. de ácido salic. corresp.	% de ácido salic. elimin.	mg. de ácido salic. total (libre + combin.)	mg. de ácido salic. prov. de la hidrólisis (total-libre)	mg. de ácido acetil salic. corresp.	% de ácido acetil salic. eliminado
1	I	25	9,00	1,17	10,75	1,75	9,28	0,23
2	I	180	52,20	6,81	61,20	9,00	11,75	1,18
4	I	140	85,40	11,15	85,20	9,80	12,79	1,28
8	I	140	81,20	10,60	92,40	11,20	14,62	1,46
16	I	240	153,00	19,97	166,50	13,60	17,75	1,78
24	I	450	81,00	10,57	85,50	4,50	5,87	0,59
1	I	74	20,72	3,53	26,64	5,72	7,46	0,75
2	I	81	31,59	4,12	35,61	4,05	5,20	0,53
4	I	126	98,28	12,82	120,96	22,68	29,60	2,96
8	I	127	77,47	10,11	85,96	8,80	11,60	1,16
16	I	365	160,00	20,96	175,20	14,60	19,65	1,91
24	I	200	76,00	9,92	88,00	12,00	15,66	1,57
1	I	51	12,24	1,62	15,80	3,06	3,99	0,40
2	I	49	29,40	3,84	36,75	7,35	9,59	0,96
4	I	230	57,50	7,50	57,50	0,00	0,00	0,00
8	I	488	168,80	22,03	175,68	6,88	8,98	0,90
16	I	600	144,00	18,79	144,80	0,00	0,00	0,00
24	I	455	72,80	9,50	72,80	0,00	0,00	0,00

Tiempo transcurrido para la recolección de orina luego de ingerir 1 g. de ácido acetil salic. equiv. a 0.766 g. de ácido salic.	N.º	Volumen en ml. de orina	mg. de ácido salic. libre correccp.	% de ácido salic. elimin.	mg. de ácido salic. total (libre + combin.)	mg. de ácido salic. conv. libre (total-libre)	mg. de ácido acetil salic. correccp.	% de ácido acetil salic. eliminado
I	133	29.30	3.17	31.05	6.75	8.81	0.88	
II	98	44.10	5.76	52.92	8.82	11.51	1.15	
4	114	79.80	10.41	103.74	23.94	31.24	3.12	
8	225	148.50	19.38	193.50	45.00	58.73	5.87	
16	750	195.00	25.45	217.50	22.50	29.36	2.94	
24	700	35.00	4.57	42.00	0.70	9.14	0.91	
I	274	24.06	3.22	27.40	2.74	3.58	0.36	
2	150	39.00	5.09	51.00	12.00	15.66	1.57	
4	100	71.00	9.27	102.00	31.00	40.46	4.05	
8	360	244.80	31.95	266.40	21.60	28.19	2.82	
16	1000	120.00	16.97	150.00	20.00	26.10	2.61	
24	530	42.40	5.53	58.30	15.00	20.75	2.08	
I	312	24.86	3.26	24.86	0.00	0.00	0.00	
2	83	34.86	4.55	41.30	6.64	8.67	0.87	
4	112	103.04	13.44	126.55	23.51	30.68	3.07	
8	296	148.00	19.31	162.80	14.80	19.31	1.93	
16	444	182.04	23.75	217.56	35.52	46.35	4.64	
24	684	54.72	7.14	54.72	0.00	0.00	0.00	
I	300	45.00	5.87	51.00	6.00	7.83	0.78	
2	34	27.20	3.65	32.30	5.10	6.66	0.67	
4	88	55.44	7.24	71.28	15.84	20.07	2.07	
8	148	119.88	15.65	137.64	17.76	23.18	2.32	
16	410	180.40	23.54	180.40	0.00	0.00	0.00	
24	750	67.50	8.89	75.00	7.50	9.79	0.98	

Horas	Promedio % de ácido salicilico eliminado	Promedio % de ácido acetil salicilico eliminado
1	2.10	0.46
2	4.92	0.89
4	10.40	1.41
8	14.25	1.17
16	10.90	1.23
24	10.00	0.72
1	3.22	0.41
2	5.13	1.20
4	11.04	3.41
8	23.55	3.54
16	22.05	3.40
24	5.75	1.00

Observando los datos y la curva se deduce que la mayor eliminación como ácido salicilico se efectúa entre las 8 y las 16 horas, para luego sufrir un brusco descenso entre las 16 y 24 horas. En cambio, como ester la eliminación alcanza un máximo a las 4 horas, permaneciendo casi constante hasta las 16 horas, para luego sufrir un descenso apreciable.

CONCLUSIONES

- 1) El método de J. Peters con las modificaciones que hemos propuesto, permite dosificar el salicilico (libre + conjugado) y el esterificado.
- 2) El método que hemos establecido para la dosificación del salicilico esterificado es de sencilla ejecución.
- 3) Los resultados obtenidos operando en las condiciones establecidas en este trabajo, dan un grado de exactitud satisfactorio, dado que se trata de un procedimiento colorimétrico y por lo mismo también desde el punto de vista del significado clínico.

Referencias

- (1) Gross, M y Greenberg: The Salicylates Critical Bibliographic Review. New Haven 60, 1948.

- (2) **Sollman, T.:** Farmacología y sus aplicaciones a la terapéutica y toxicología. Trad. Anguera, Subirana y Estellés, 728, 1949.
- (3) **Velázquez, L.:** Terapéutica con sus fundamentos de Farmacología experimental. Ed. Científico-Médica, 1: 395, 1953.
- (4) **Ayala Bonilla, W.:** An. Asoc. Quím. Farm. Uruguay, 35: 118, 1938.
- (5) **Deniges, G.:** Précis de Chimie Analytique, 1088, 1920.
- (6) **Smith, J. H.:** J. Pharmacol., 3: 409, 1951.
- (7) **Peters, J. T.:** Chem. Abst., 42: 3015, 1948.
- (8) **Kolthoff, I. M. y Sandell, E. B.:** Tratado de Química Analítica Cuantitativa. Ed. Nigar. Trad. Prelat, 801, 1947.
- (9) **Allport, N. L.:** Colorimetric Analysis. Ed. Chapman y Hall, 163, 1947.
- (10) **Evans, E. E. L.:** Electroselenium Limited. Prosp. 6.

