

Determinación de la constante de acidez del metronidazol por espectroscopia ultravioleta en medio acuoso

Determination of the acidity constant of metronidazole by ultraviolet spectroscopy in the aqueous medium

J. H. Villanueva-Reynoso ^a, D. S. Guzmán-Hernández ^{b,*}, M. T. Ramírez-Silva ^a, J. Juárez-Gómez ^a
A. Rojas-Hernández ^a

^a Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1era Sección, Alcaldía Iztapalapa, 09310 Ciudad de México, México.

^b CONACYT-Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09310, Ciudad de México, México.

Resumen

En este trabajo se determinó una constante de acidez (pK_a) para la molécula de metronidazol protonado ($MTZH^+$) por espectroscopía de ultravioleta (UV) en medio acuoso. Los valores experimentales obtenidos se trataron con el programa computacional (SQUAD) obteniendo un valor de $pK_a = (2.522 \pm 0.001)$. Así mismo se obtuvieron por primera vez los coeficientes de absorptividad molar para cada especie del metronidazol, encontrando que para $pH < 2.522$ predomina la especie catiónica ($MTZH^+$) y a $pH > 2.522$ la especie neutra (MTZ).

Palabras Clave: constante de acidez, metronidazol, espectroscopia UV, programa SQUAD.

Abstract

In this work, an acidity constant (pK_a) was determined for the metronidazole protonated species by ultraviolet (UV) spectroscopy, the experimental value obtained was treated with the computer program (SQUAD) obtaining a value of $pK_a = (2.522 \pm 0.001)$. Therefore, at $pH < 2.522$, the cationic species ($MTZH^+$) predominates and at $pH > 2.522$, the neutral species (MTZ) predominates. Likewise, the molar absorptivity coefficients for each species were obtained for the first time.

Keywords: acidity constant, metronidazole, UV spectroscopy, SQUAD program.

1. Introducción

El metronidazol (MTZ) (Figura 1), es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario. Se encuentra clasificado dentro de los nitroimidazoles (Bendesky, 2001), sustituido en carbono -1, -2 y -5 con grupos 2-hidroxietilo, nitro y metilo. Tiene una solubilidad aproximada de 6 mg/mL a 20° C. (Pamar, 2021).

El metronidazol, se usa para tratar infecciones causadas por bacterias anaerobias y protozoarios. Fue aprobado por la asociación de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para uso humano en 1963 y se encuentra disponible en formulación oral, parenteral, vaginal y tópica.

La acción antimicrobiana de los compuestos nitroimidazólicos es producida dentro de los microorganismos

patógenos, debido a que algunas formas reducidas del grupo nitro interactúan con el DNA del microorganismo causando daños estructurales e impidiendo su reproducción (Dobiáš, 1994).

El MTZ, debido a sus propiedades farmacológicas, es ampliamente recetado, siendo el 60-80 % desechado por la orina y del 6-15 % por las heces. Una vez administrado puede ser excretado sin sufrir transformación, dicha excreción en forma de orina o heces ha provocado la presencia y acumulación de este fármaco dentro de aguas residuales, causando efectos adversos para los seres humanos (resistencia bacteriana) y el entorno ecológico. Se han encontrado concentraciones de 0.112 a 40 $\mu\text{g/L}$ de MTZ en plantas de tratamiento de aguas hospitalarias y residuales. (Gómez, 2006). Es por lo que varios investigadores se han interesado en

*Autor para la correspondencia: dsguzman@conacyt.mx

Correo electrónico: josahayra@gmail.com (Josa Hayra. Villanueva-Reynoso), dsguzman@conacyt.mx (Dafne Sarahia Guzmán-Hernández) mtrs218@xanum.uam.mx (María Teresa Ramírez-Silva), elinge85@gmail.com (Jorge Juárez-Gómez), suemi918@xanum.uam.mx (Alberto Rojas-Hernández).

el estudio de este fármaco. Marta Wagil *et al.* (2006), han determinado metronidazol en agua, sedimentos y tejidos de pez en el río Goscicina en el norte de Polonia. Encontraron concentraciones de 0.136 $\mu\text{g/L}$ en agua, 0.12 $\mu\text{g/g}$ en sedimentos y 0.15 $\mu\text{g/g}$ en tejidos de pez.

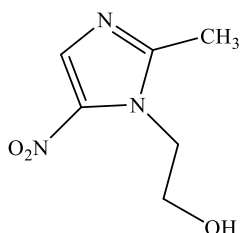


Figura 1: Fórmula desarrollada del metronidazol (MTZ).

Debido a lo descrito anteriormente es importante conocer las características fisicoquímicas del MTZ y las interacciones que puede tener con otros analitos en medio acuoso. Hasta ahora Gallo *et al.* (1964), han reportado la constante de acidez ($\text{pK}_a = 2.55$) en medio acuoso cuyo valor de pK_a fue obtenido por el método de Hammett H_0 y a dos longitudes de onda. Es decir, no miden el valor de pH experimental y tampoco obtienen una familia de espectros. Otros autores como Eugene Osoikhia *et al.* (2019), determinan por potenciometría una constante de acidez del metronidazol en diferentes mezclas de disolventes orgánicos. En una mezcla del 50 % metanol (MeOH) y 50 % agua (H_2O), reportan un pK_a de 1.62, para una mezcla del 50 % etanol (EtOH) y 50 % MeOH reportan un pK_a de 2.99 y un pK_a de 2.87 en una mezcla del 50 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y 50 % de MeOH. Ya que no existen muchos trabajos donde se determine la constante de acidez de MTZ, es importante la confirmación de este parámetro fisicoquímico en medio acuoso utilizando las nuevas tecnologías y materiales, es por ello que en este trabajo se presenta la determinación de la constante de acidez mediante espectroscopía de ultra violeta (UV).

2. Experimental

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. MTZ (Sigma Aldrich $\geq 98\%$), NaOH estandarizado (J.T. Baker), HCl estandarizado (J. T. Baker), NaCl (J.T. Baker). El sistema se mantuvo a temperatura constante ($25\text{ }^\circ\text{C}$), en atmósfera inerte de N_2 , y protegido de la luz.

Se utilizó un equipo UV (Perkin Elmer Lambda 950), celdas de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico; potenciómetro (Hach pH 31), electrodo de vidrio combinado (Hach 5010T y serie 16097), agua desionizada (Milli Q Millipore, serie 1060 y resistividad $18.2\text{ M}\Omega\text{-cm}$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$).

En una celda termostata se preparó una solución de MTZ $1.20 \times 10^{-4}\text{ M}$. Se mantuvo la fuerza iónica con una solución de cloruros 0.1 M y se varió el valor de pH de la solución de 9.96 a 1.05. Para cambiar los valores de pH se utilizaron soluciones de NaOH 0.1 M y HCl 0.1 M , según fuera necesario. Para cada solución preparada se midió el pH y se registraron los espectros de absorción UV (37 espectros).

3. Resultados y discusión

El metronidazol se encuentra dentro de la clase de nitroimidazoles ya que tiene un anillo aromático de cinco

miembros con dos átomos de nitrógeno, llamado imidazol. Los imidazoles son estables en medio ácido con la protonación del nitrógeno en la posición N-3 (Wade, 2010). En la Figura 1 se observa que el MTZ tiene un grupo funcional nitro y un grupo imidazol, los cuales presentan transiciones electrónicas de $\eta \rightarrow \Pi^*$ dando una banda de absorción en la región espectral de 200 nm a 700 nm. En la literatura se encuentra reportado que el grupo nitro presenta un máximo de absorción a 271 nm y el grupo imidazol un máximo de absorción a 340 nm. Por lo que es posible obtener los espectros de absorción de UV del metronidazol (Wade, 2010).

En la Figura 2 se observa una familia de espectros de absorción UV del metronidazol $120\text{ }\mu\text{M}$ obtenidos a diferentes valores de pH. Es posible observar que a pH 9.96 el máximo de absorbancia ($A_{\text{máx}}$) está en 320 nm y conforme disminuye el pH se observa un corrimiento batocrómico del máximo hasta llegar a 276 nm. A 320 nm hay un desplazamiento hipocrómico en tanto que a 276 nm el desplazamiento es hiperocrómico. También se observa un punto isobéptico a 292 nm, el cual pone en evidencia la existencia de al menos un equilibrio ácido-base para el metronidazol.

En la Figura 3 se presentan las curvas de absorbancia a 320 nm (a) y a 276 nm (b) como función del pH. Se observa una sigmoide en ambos casos por lo que se propone un equilibrio de acidez con un valor de $-\log K_a = \text{pK}_a$ en 2.5, Ecuación 1.

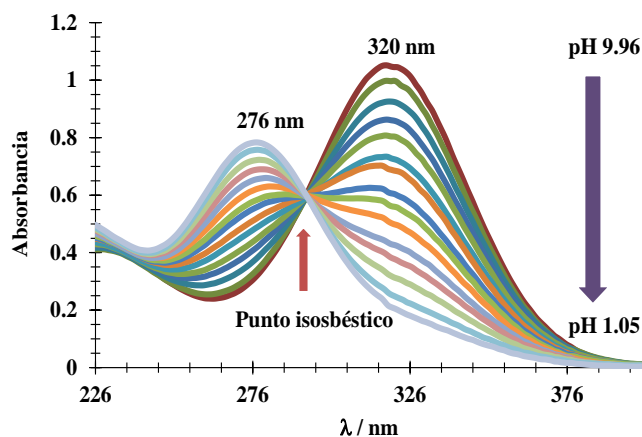
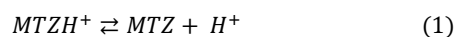


Figura 2: Familia de espectros de absorción UV de metronidazol $120\text{ }\mu\text{M}$ a diferentes valores de pH.



Para el cálculo de la constante de acidez, se utiliza el programa computacional SQUAD (Leggett, 1985). Este programa, escrito en FORTRAN, está diseñado para realizar cálculos y obtener el valor de las constantes de formación de un modelo propuesto, a partir del método de mínimos cuadrados. Este cálculo se lleva a cabo minimizando la suma de los residuos al cuadrado de los valores de absorbancia (U). El programa ha sido utilizado para llevar a cabo estudios de equilibrios ácido-base para ligandos que pueden ser ácidos o bases débiles, complejos mixtos a partir de metales y ligandos; complejos protonados o hidroxocomplejos (Balderas, 2008).

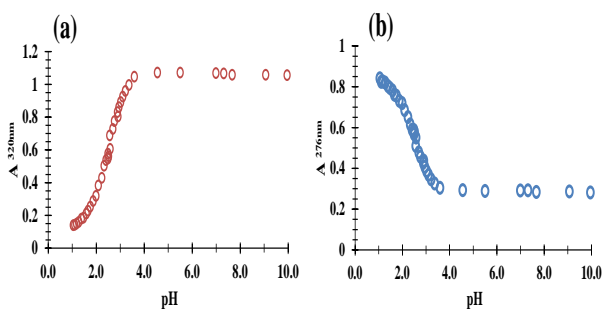


Figura 3: Curvas sigmoideas. a) $A_{320\text{nm}} = f(\text{pH})$, b) $A_{276\text{nm}} = f(\text{pH})$.

El programa computacional SQUAD requiere como datos de entrada un equilibrio químico propuesto. Para el caso del MTZ el equilibrio químico propuesto se muestra en la ecuación 1, los valores de absorbancia (175 puntos de absorbancia por cada espectro) de UV obtenidos experimentalmente, los valores de pH para cada espectro obtenido, la concentración de la molécula MTZ y la propuesta de una constante de acidez del equilibrio. Para este estudio, SQUAD se alimentó con 37 espectros que corresponden a los 37 valores de pH en un intervalo de longitud de onda de 226 nm a 400 nm, con incrementos de 1 nm, y con una concentración de MTZ de 1.20×10^{-4} M y un valor de pKa propuesto de 2.5. En la Tabla 1, se muestra el valor refinado del pKa de la molécula de MTZ obtenido como dato de salida de SQUAD, con su desviación estándar y la suma de cuadrados.

Tabla 1: Valor de la constante de acidez obtenida a partir del programa computacional SQUAD.

(pKa ± ΔpKa)	Suma de cuadrados de absorbancia (U)	Desviación estándar de la regresión (σ_{reg})
2.522 ± 0.001	0.348	0.008

Así mismo SQUAD calcula los coeficientes de absorptividad para cada longitud de onda con sus respectivas desviaciones estándar, ver Figura 4.

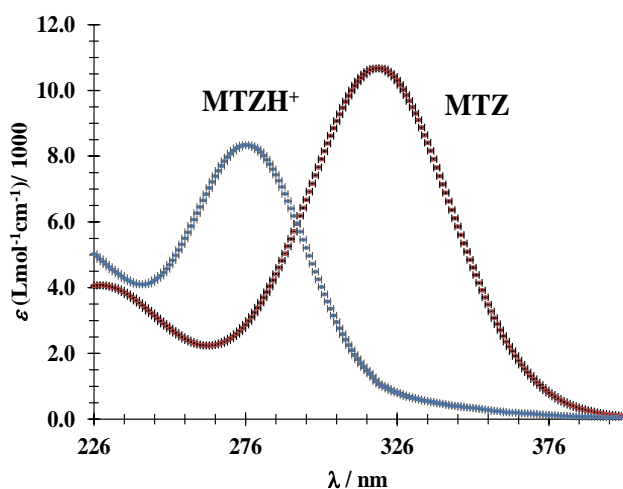


Figura 4: Gráfico de los coeficientes de absorptividad molar para las especies MTZH^+ (color azul) y MTZ (color rojo), obtenidos a partir de SQUAD como una función de la longitud de onda, con sus barras de error.

En la Tabla 2 se muestran los valores de los coeficientes de absorptividad correspondientes para cada especie de metronidazol en las longitudes de onda de 276 y 320 nm.

Tabla 2: Coeficientes de absorptividad molar para las especies de metronidazol a diferentes longitudes de onda.

	$\lambda = 276 \text{ nm}$	$\lambda = 320 \text{ nm}$
$\epsilon_{\text{MTZH}^+} / \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	8340	1074
$\epsilon_{\text{MTZ}} / \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	2874	10074

En la Figura 5 se presentan los espectros de absorción de UV para el metronidazol (líneas continuas verde y roja) ajustados a partir de los datos proporcionados por SQUAD, comparados con los espectros experimentales (marcadores). Es posible observar que los espectros se ajustan bien con el modelo, lo que nos indica la confiabilidad de la constante de acidez y los coeficientes de absorptividad molar determinados.

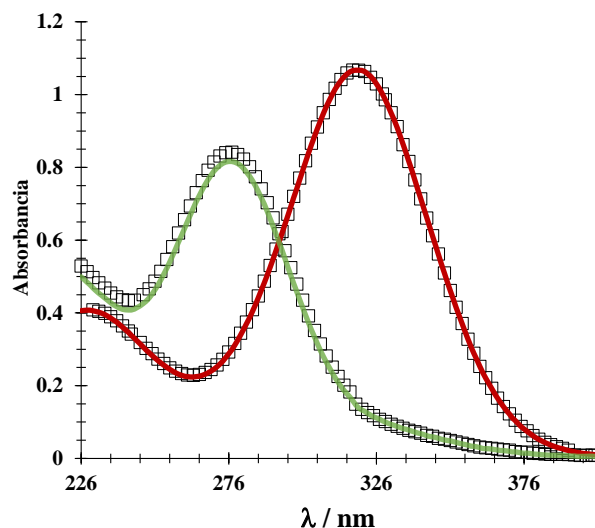


Figura 5: Espectros de absorción de UV para metronidazol ajustados a partir de los datos obtenidos por SQUAD, a pH = 1.05 (línea continua verde) y a pH = 9.96 (línea continua roja). Los espectros obtenidos experimentalmente a esos valores de pH se muestran con los marcadores cuadrados.

Finalmente se muestra el diagrama de zonas de predominio de las especies de metronidazol en solución acuosa lineal en función de pH, ver Figura 6, siguiendo la metodología propuesta por Rojas-Hernández *et al.* (1991, 1992, 1993), donde finalmente se resume que el metronidazol tiene dos especies en equilibrio donde predomina la especie protonada (MTZH^+) a valores de pH menores que 2.522 y la especie neutra (MTZ) a un pH mayor que 2.522.

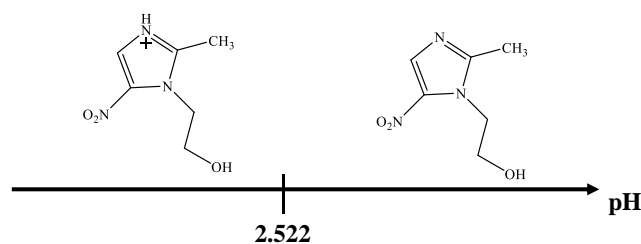


Figura 6: Diagrama de zonas de predominio lineal en función de pH siguiendo la metodología propuesta por Rojas-Hernández *et al.*

4. Conclusiones

Se obtuvieron los espectros de absorción UV experimentales a diferentes valores de pH para el metronidazol en solución acuosa. Se determinó un valor de $pK_a = (2.522 \pm 0.001)$, este valor es congruente con el reportado en 1964 por Gallo *et al.* (2.55) por lo que se ha corroborado experimentalmente el valor de la constante de acidez. Además, por primera vez se reportan los coeficientes de absorptividad molar de las especies ácido-base del metronidazol en un intervalo de longitudes de onda de 226 a 400 nm, que fueron obtenidos con el programa computacional SQUAD.

Agradecimientos

DSGH y MTRS agradecen a CONACYT por la cátedra 2159. JHVR agradece el apoyo brindado por el área de Química Analítica de la UAM-I. MTRS, DSGH, JJG, y ARH agradecen al SNI por la distinción otorgada. MTRS agradece a la DCBI de la UAM-Iztapalapa por el año sabático concedido.

Referencias

- Balderas-Hernández, P., Ramírez-Silva, M. T., Romero-Romo, M., Palomar-Pardavé, M., Roa-Morales, G., Barrera-Díaz, C., Rojas-Hernández, A., (2008). Experimental correlation between the pK_a value of sulfonphthaleins with the nature of the substituents groups. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(4), 1235-1245.
- Bendesky, A., Menéndez, D., (2001). Metronidazol: una visión integral. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*, 44(6), 255-259.
- Dobiáš, L., Černá, M., Rössner, P., Šrám, R., (1994). Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research Reviews in Genetic Toxicology*, 317(3), 177-194.
- Gallo, G. G., Pasqualucci, C. R., Radaelli, P., Lancini, G. C., (1964). The ionization constants of some imidazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 29 (4), 862-865.
- Leggett, D. J. (1985). SQUAD. In: *Computational methods for the determination of formation constants*. D. J. Leggett (Ed), Springer, Boston, MA. pp. 159-220.
- Pramar, Y. V., Mandal, T. K., Bostanian, L. A., Le, G., Morris, T. C., Graves, R. A., (2021). Physicochemical and microbiological stability of compounded metronidazole suspensions in PCCA SuspendIt. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 25(2), 169-175.
- Rojas-Hernández, A., Ramírez, M. T., Ibáñez, J. G., González, I., (1991). Relationship of multidimensional predominance-zone diagrams with multiconditional constants for complexation equilibria. *Analytica Chimica Acta*, 246 (2), 435-442.
- Rojas-Hernández, A., Ramírez-Silva, M. T., Ibáñez, J. G., González, I., (1991). Construction of multicomponent Pourbaix diagrams using generalized species. *Journal of the Electrochemical Society*, 138 (2), 365.
- Rojas-Hernández, A., Ramírez-Silva, M. T., González, I., Ibáñez, J. G., (1992). Multi-dimensional predominance-zone diagrams for polynuclear chemical species. *Analytica Chimica Acta*, 259 (1), 95-104.
- Rojas-Hernández, A., Ramírez, M. T., González, I., (1993a). Equilibria among condensed phases and a multi-component solution using the concept of generalized species: Part I. Systems with mixed complexes, *Analytica Chimica Acta*, 278(2), 321-333.
- Rojas-Hernández, A., Ramírez, M. T., González, I., (1993b). Equilibria among condensed phases and a multi-component solution using the concept of generalized species: Part II. Systems with polynuclear species. *Analytica Chimica Acta*, 278 (2), 335-347.
- Wade, L.G. Jr., *Química Orgánica*. (2010). Pearson, México.
- Wagil, M., Maszkowska, J., Białk-Bielińska, A., Caban, M., Stepnowski, P., Kumirska, J., (2015). Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples. *Chemosphere*, 119, S28-S34.