

R.2623

T:35

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA

Y ANALISIS QUIMICO APLICADO

SINTESIS, PROPIEDADES Y

CARACTERIZACION ANALITICA DEL ACIDO

5-(2-TIOFEN) METILEN-2-TIOBARBITURICO

TESINA DE LICENCIATURA PRESENTADA POR

FRANCISCO JAVIER BAUTISTA PALOMA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

JOSE MARIA TRILLO DE LEYVA, Catedrático-Director del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla

CERTIFICO: Que el presente trabajo, realizado por D. Fco. Javier Bautista Paloma, ha sido - llevado a cabo en el Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado, bajo la dirección del Profesor Adjunto-Encargado de Cátedra Dr. D. Matías Guzmán Chozas, durante el tiempo exigido y reuniendo - los requisitos necesarios para este tipo de trabajos.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla, a 16 de Junio de mil novecientos ochenta y dos.



Fdo. J. MA Trillo de Leyva

MATIAS GUZMAN CHOZAS, Profesor Adjunto-Encar~~g~~ado de Cátedra del Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico Aplicado de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICO: Que la presente Tesina de Licenciatura, que presenta D. Fco. Javier Bautista Paloma, ha sido realizada en este Departamento, bajo mi dirección, desde Enero de 1981 hasta Junio de 1982, reuniendo a mi juicio, los requisitos exigidos a los trabajos de Licenciatura.

Y para que conste, firmo la presente certificación en Sevilla, a 16 de Junio de mil novecientos ochenta y dos.

Fdo. M. Guzmán Chozas

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA
Y ANALISIS QUIMICO APLICADO

Deseo expresar mi más sincera gratitud:

Al Prof. Dr. D. José María Trillo de Leyva, por darme la oportunidad de llevar a cabo estas investigaciones.

Al Dr. D. Matías Guzmán Chozas, por su eficaz dirección y el gran interés demostrado a lo largo de la realización de todo el trabajo.

A todos los compañeros del Departamento, y en especial a los Licenciados Dña Ana M^a Camerán Fernández y D. Miguel M^a Benítez Uceda, por su amistad y colaboración.

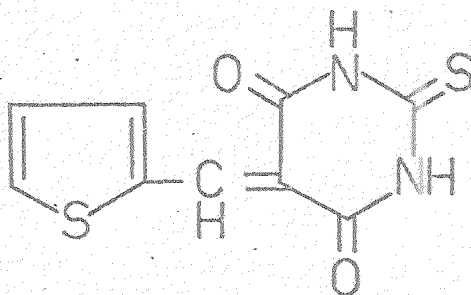
A todos los compañeros y personal de otros Departamentos, por su ayuda prestada.

A mis padres

A Pilar

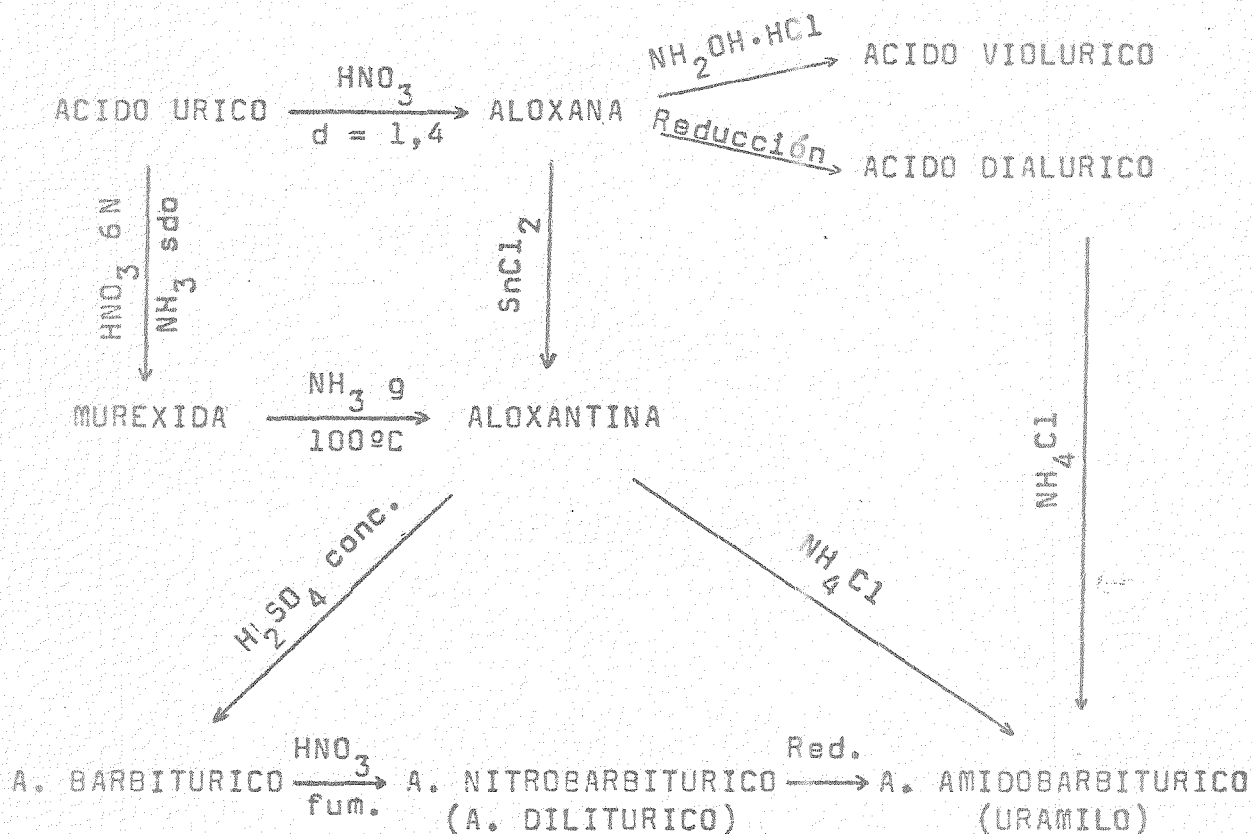
INTRODUCCION

Con este trabajo planteamos un tema de investigación que iniciamos con el estudio de la caracterización, identificación y determinación analítica del ácido 5-(2-tiofen) metilen-2-tiobarbitúrico (TTB),



El propósito general es la obtención, caracterización de las propiedades físico-químicas y farmacológicas y determinación analítica de toda una serie de derivados en C-5 del ácido 2-tiobarbitúrico con distintos tipos de aldehidos.

El más importante de los ureidos cíclicos encontrados en la naturaleza es el ácido úrico, descubierto por Scheele en 1776. Entre los productos de degradación del ácido úrico:



se encontró el ácido barbitúrico (nombre que le fue dado por Adolf von Baeyer en 1864, motivado por la galantería hacia una amiga suya llamada Bárbara); sus derivados se han usado en medicina desde que fueron introducidos por Fisher y Von-Mehring en 1903, siendo el barbital (veronal) el primero que se empleó en terapéutica (1,2,3). Estos fármacos, con acción

preferente sobre el sistema nervioso central, se clasifican como hipnóticos, pero su acción terapéutica depende de la dosis, la vía de administración y el tipo de barbitúrico implicado, de tal forma que pueden actuar como sedantes e incluso como anestésicos (los de acción ultracorta) (4,5,6).

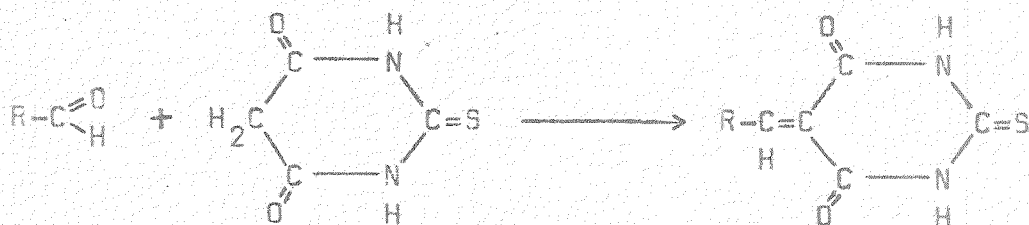
Los derivados de los ácidos barbitúrico y tiobarbitúrico con una fuerte actividad depresora del sistema nervioso central presentan los átomos de hidrógeno en posición C-5 reemplazados por radicales univalentes (barbital, fenobarbital, tiopental, etc.). En los compuestos cuya síntesis y estudio proponemos, los dos hidrógenos del grupo metileno ($>CH_2$) en C-5 del ácido 2-tiobarbitúrico se sustituyen por un resto metínico divalente. Este tipo de barbitúricos no han sido ensayados ni examinados, si exceptuamos los derivados del pirrol-2-aldehído (7), que demostraron poseer actividad hipnótica y espasmolítica. De ahí el interés que, creemos, puede tener esta línea, que abre un campo de amplias posibilidades.

CAPITULO I

SINTESIS Y CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DEL
ACIDO 5-(2-TIOFEN) METILEN-2-TIOBARBITURICO

1.1. SINTESIS

Los ácidos barbitúrico y tiobarbitúrico reaccionan con aldehidos en presencia de ácido clorhídrico o piridina como agente condensante, de acuerdo con el siguiente esquema:



Aunque esta reacción se conoce desde hace mucho tiempo (8), sin embargo, apenas se ha hecho aplicación de ella. Hace algunos años, se realizó la síntesis de derivados del ácido barbitúrico, y del tiobarbitúrico, con aldehidos pirrólicos saturados (8); se obtuvieron una serie de compuestos que presentaban interesantes propiedades hipnóticas y sedantes.

La obtención del ácido 5-(2-tiofen) metilen-2-tiobarbitúrico (TTB) se lleva a cabo en medio ácido, con un rendimiento superior al 95% (7), según la siguiente técnica:

TECNICA: En un matraz Erlenmeyer de 100 ml se disuelven 0,500 g de ácido tiobarbitúrico en 20 ml de ácido clorhídrico 4M, y se añade lentamente y agitando 0,40 ml de tiofen-2-

aldehído. Se continúa la agitación mecánicamente durante 20 minutos, utilizando un agitador magnético y una temperatura entre 30 y 40°C. Aparece un precipitado amarillo, que se separa por filtración y se lava repetidamente con agua caliente y etanol. Se deja secar sobre CaCl_2 . Se puede recristalizar en etanol.

El punto de fusión se determinó mediante un microscopio con platina de Kofler calentada eléctricamente. Se alcanzaron los 300°C sin que el producto fundiera, lo --- cual es una prueba de su estabilidad.

El análisis elemental de esta sustancia ha arrojado los siguientes resultados, que se comparan con los --- calculados teóricamente:

ANALISIS ELEMENTAL

	CALCULADO	ENCONTRADO
%C	45,37	45,36
%H	2,52	2,78
%N	11,76	11,81
%S	26,89	26,76

I.2. SOLUBILIDAD

Se ensaya la solubilidad de 20 mg de TTB en distintos disolventes. Para ello, se pone el TTB en un vaso de precipitados y se va añadiendo el disolvente en cantidades crecientes, al mismo tiempo que se agita con una varilla de vidrio, hasta conseguir la disolución del TTB.

Los términos de solubilidad se asignan de acuerdo con los criterios de la Farmacopea Internacional (9).

TERMINOS DESCRIPTIVOS	NUMERO DE ml DEL DISOLVENTE REQUERIDOS PARA 1g DEL SOLIDO
Muy soluble	Menos de 1
Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Poco soluble	De 30 a 100
Ligeramente soluble	De 100 a 1.000
Muy ligeramente soluble	De 1.000 a 10.000
Prácticamente insoluble	Más de 10.000

Los resultados de estos ensayos se reflejan en la Tabla I-a.

TABLE I-aSOLUBILIDAD DEL TTB

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD
Acido perclórico 0,1 N	Prácticamente insoluble
Acido clorhídrico 0,1 N	Prácticamente insoluble
Acido sulfúrico 0,1 N	Prácticamente insoluble
Acido acético 0,1 N	Prácticamente insoluble
Acetato amónico	Prácticamente insoluble
Hidróxido amónico 6 N	Fácilmente soluble
Hidróxido sódico 0,1 N	Poco soluble
Acetona	Ligeramente soluble
Benceno	Prácticamente insoluble
Cloroformo	Muy ligeramente soluble
Dimetilformamida	Soluble
Dimetilformamida-agua 9:1	Poco soluble
Dimetilformamida-agua 7:1	Ligeramente soluble
Dimetilformamida-agua 4:1	Ligeramente soluble
Dimetilformamida-agua 3:2	Muy ligeramente soluble
Dioxano	Soluble
Etanol	Ligeramente soluble
Eter etílico	Muy ligeramente soluble

TABLA I-aSOLUBILIDAD DEL TTB

DISOLVENTE

SOLUBILIDAD

Etilenglicol	Ligeramente soluble
Isopropanol	Prácticamente insoluble
Manitol	Prácticamente insoluble
Polietilenglicol-400	Ligeramente soluble
Propilenglicol	Ligeramente soluble
Tolueno	Prácticamente insoluble

Se ha estudiado también su solubilidad a distintos pH utilizando disoluciones reguladoras adecuadas, recogiendo los resultados en la Tabla I-b.

Se observa que el TTB se solubiliza en disoluciones acuosas alcalinas. En medios no acuosos, se solubiliza en aquellos disolventes que tienen carácter protofílico, como la dimetilformamida (DMF) y el dioxano.

Con vistas a la realización de ensayos farmacológicos, se ha determinado la solubilidad del TTB en aceite de oliva, emulgentes, mezclas hidroalcohólicas, hidroglicólicas y de alcoholes y glicoles. De los resultados de estas experiencias, contenidos en la Tabla I-c, se deduce la idoneidad de las mezclas polietilenglicol-400:etanol.

1.3. CARACTERISTICAS ESPECTRALES

1.3.1. Espectro infrarrojo

Se registra el espectro infrarrojo del TTB entre 600 y 4.000 cm^{-1} , empleando un disco de KBr como soporte. En la Figura 1 se representa dicho espectro, y en la Tabla - II figuran las asignaciones de las bandas más características. Estas asignaciones están de acuerdo con la fórmula prevista.

1.3.2. Espectro de masas

Hemos registrado el espectro de masas del TTB

TABLA I-bINFLUENCIA DEL pH SOBRE LA SOLUBILIDAD DEL ITB

pH	SOLUBILIDAD
5,2	Prácticamente insoluble
8,6	Prácticamente insoluble
9,0	Muy ligeramente soluble
9,5	Muy ligeramente soluble
10,1	Muy ligeramente soluble
10,5	Muy ligeramente soluble
11,1	Muy ligeramente soluble
11,7	Ligeramente soluble
12,1	Ligeramente soluble
12,7	Ligeramente soluble

TABLA I--cSOLUBILIDAD DEL TTB

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD
Aceite de oliva	Muy ligeramente soluble
Etilenglicol:agua 1:4	Prácticamente insoluble
Etanol:glicerina 5:1	Prácticamente insoluble
Etanol:glicerina 2:1	Prácticamente insoluble
Polietilenglicol-400:agua 2:1	Ligeramente soluble
Polietilenglicol-400:agua 1:1	Muy ligeramente soluble
Polietilenglicol-400:etanol 2:1	Ligeramente soluble
Polietilenglicol-400:etanol 1:1	Ligeramente soluble
Polietilenglicol-400:etanol 1:4	Ligeramente soluble
Polietilenglicol-400:etanol 1:5	Muy ligeramente soluble
Polietilenglicol-400:propilenglicol 2:1	Ligeramente soluble
Propilenglicol:agua 3:1	Prácticamente insoluble
Propilenglicol:agua 1:1	Prácticamente insoluble
Span-80:agua 1:1	Poco soluble (emulsión)
Tween-20:agua 1:4	Prácticamente insoluble
Tween-80:agua 1:1	Prácticamente insoluble

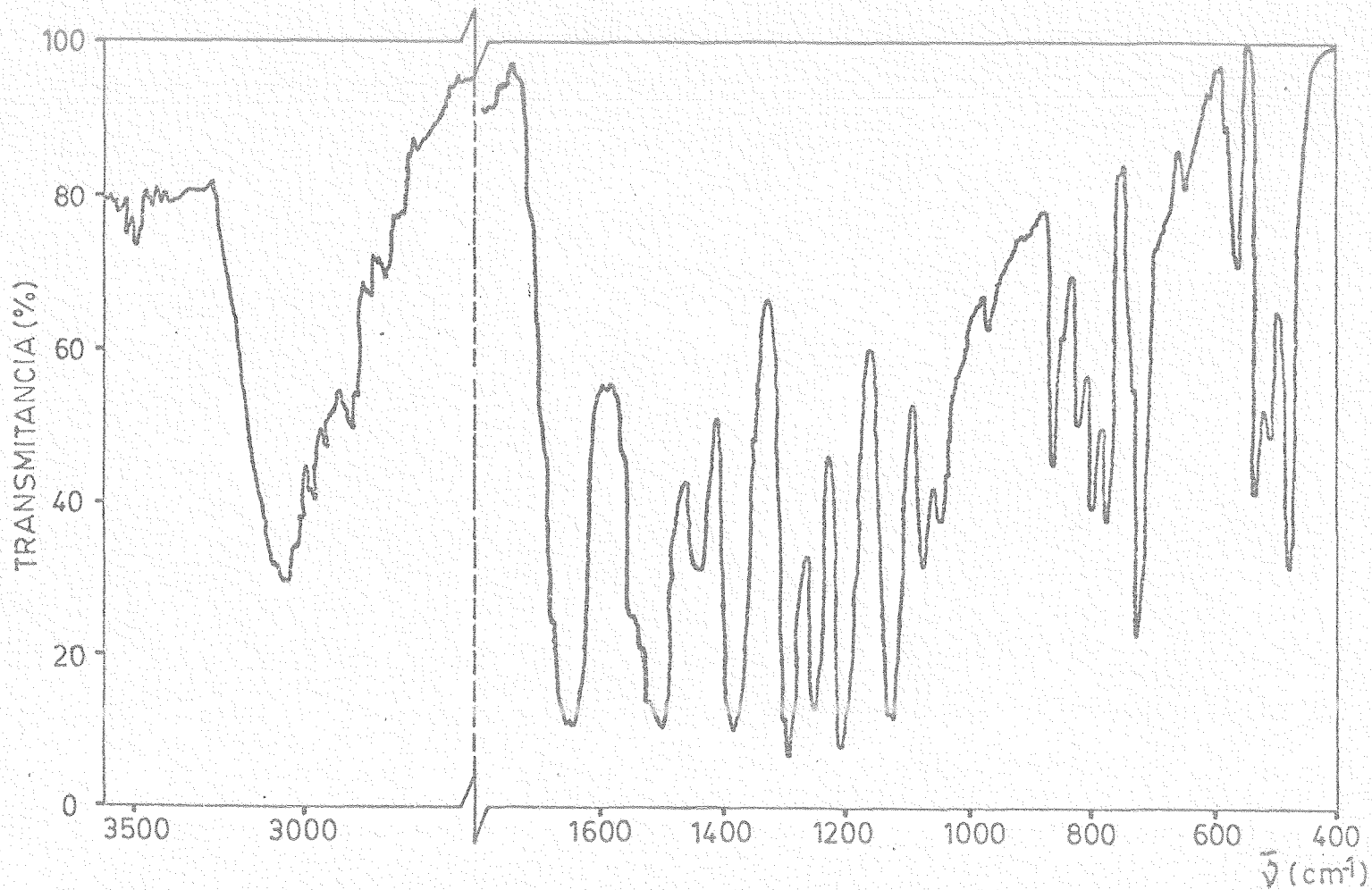


Fig.1. - Espectro I.R. del TTB

TABLA IIINTERPRETACION DEL ESPECTRO I.R. DEL TT8

TIPOS DE VIBRACIONES (cm^{-1})	ASIGNACION	
Vibraciones de tensión	3100s	-CH (anillo de tiofeno)
	2860s	
	1650s	C=O (C=O de tiofeno)
	1210s	
	1500s	-N=C=S
	1130s	
	1300s	C=S
	1390s	-N=C=O
1250ms	C-N	
Vibraciones de flexión	1560m	-NH
	865m	
	820wm	-CHoop
	980w	
730s	-CHoop (anillo de tiofeno)	

y en la Figura 2 representamos los picos más importantes. En el Esquema 1 se señalan las posibles escisiones del TTB.

La pérdida de C=O, -SH y -OH a partir del ión padre origina distintos valores de m/e. Los iones con m/e - 164 (71%) y 195 (7%) pueden justificarse en base a fisiones simples del anillo de tiofeno (10). El ión molecular se disocia por pérdida de (-NHCO + -NHCS) para dar el pico base, de m/e 136 (100%). La pérdida de C=S y -C₂H₂ a partir del catión α -tiofeno, m/e 83 (47%), origina las especies C₃H₃⁺, m/e 39 (64%) y CH=C-S, m/e 57 (54%), respectivamente.

1.3.3. Espectro ultravioleta-visible

Los espectros de absorción U.V.-visible del TTB en agua, etanol, acetona y dimetilformamida muestran máximos de absorción similares entre 390 y 415 nm, aunque se observa un efecto hipocrómico al cambiar de agua a dimetilformamida como disolvente (Figura 3).

La concentración del compuesto en todas las medidas es $2,0 \cdot 10^{-5}$ M. Se utiliza como blanco el disolvente.

Los espectros de absorción U.V.-visible en medio acuoso, a distintos pH, se representan en la Figura 4. En medio ácido fuerte y débil se observa un máximo de absorción a 412 nm, que sufre un desplazamiento hipsocrómico hasta 265 nm en medio neutro y hasta 285 nm en medio alcalino. Al mismo tiempo, el compuesto ha vambiado de color amarillo a incoloro. En el Esquema 2 se muestran las distintas formas del TTB en solución.

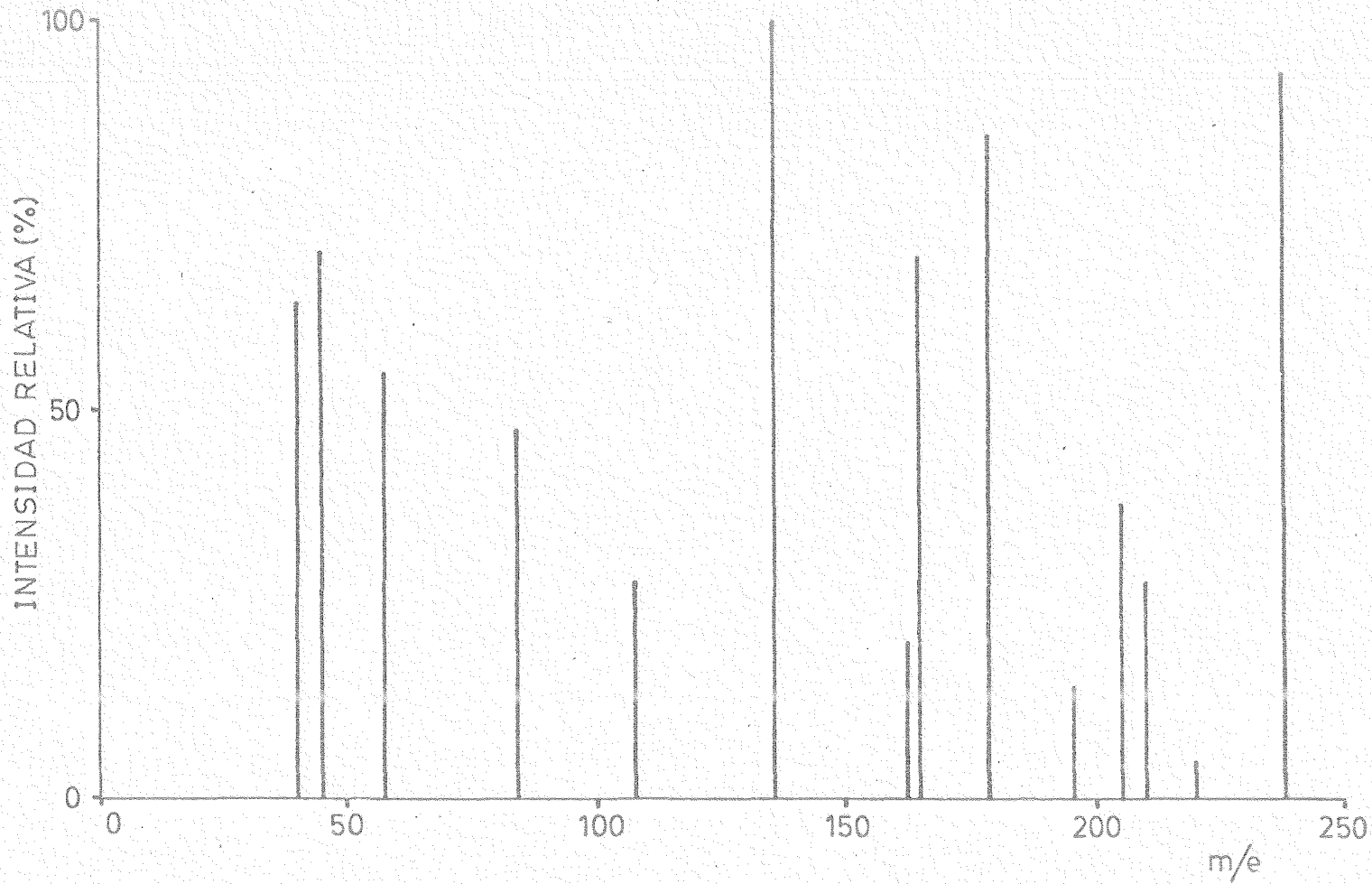
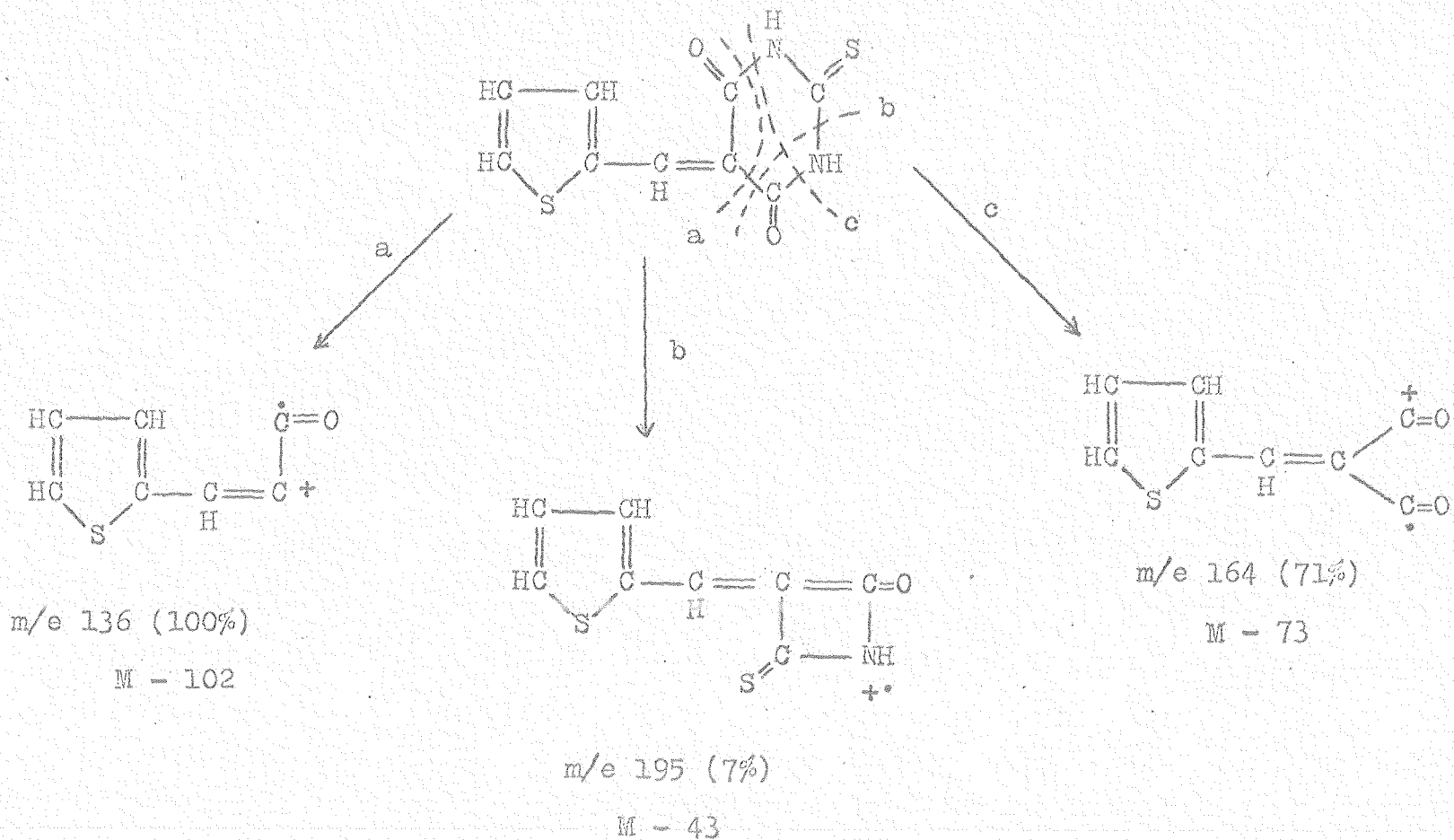
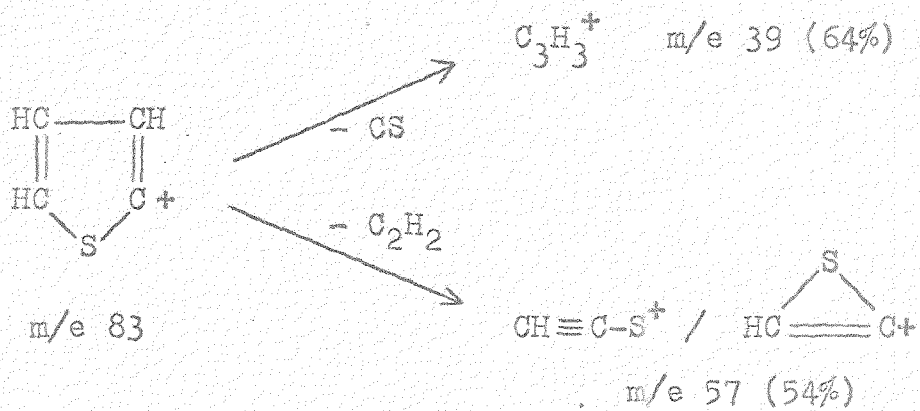
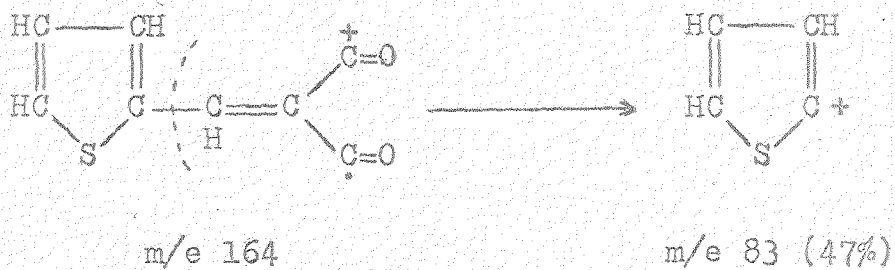


Fig.2.- Espectro de masas del TTB

INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE MASAS DEL TTB



ESQUEMA 1 (continuación)



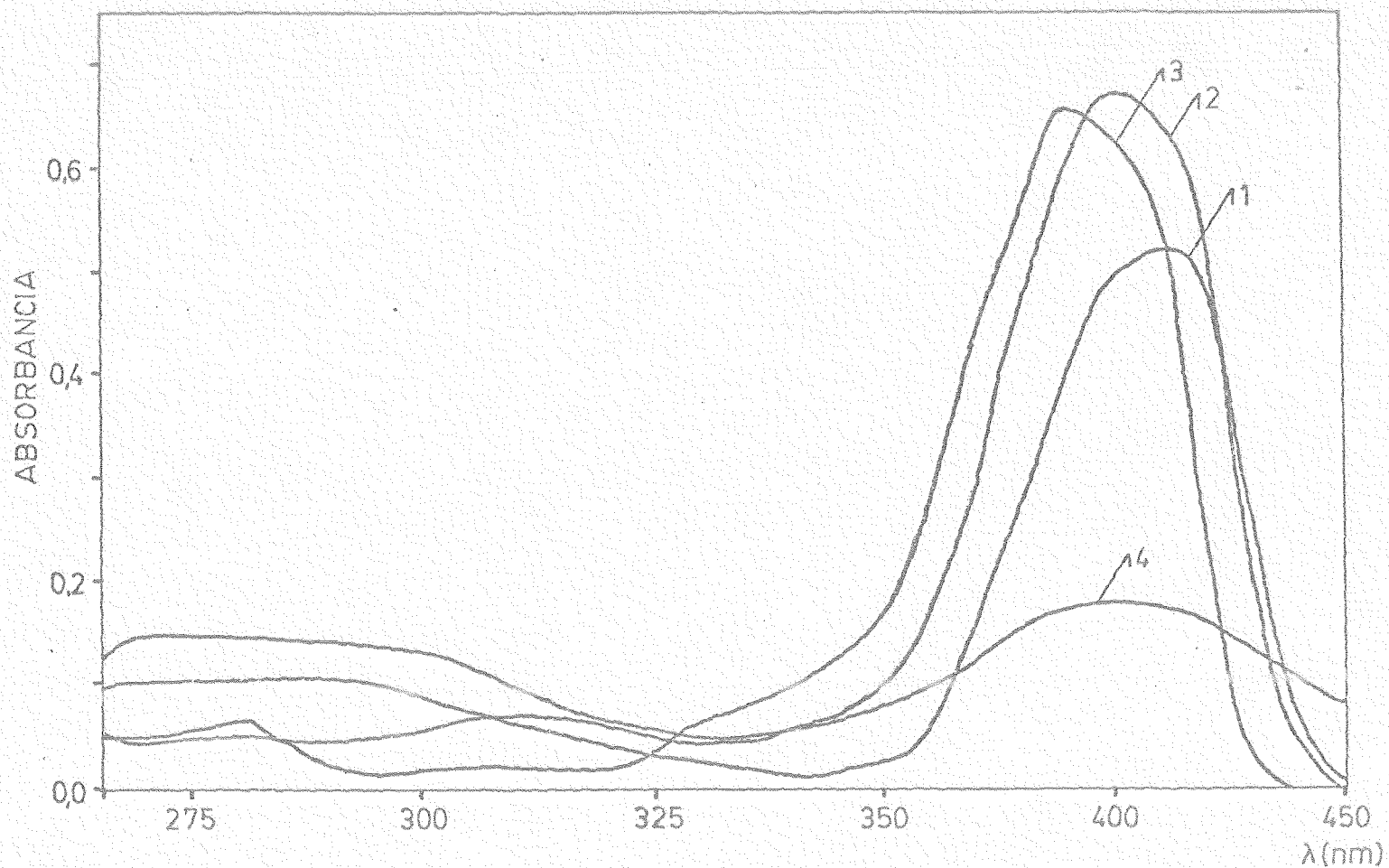


Fig.3.- Espectro U.V.-visible del TTB en distintos disolventes: 1.- agua; 2.- etanol; 3.- acetona; 4.- dimetilformamida

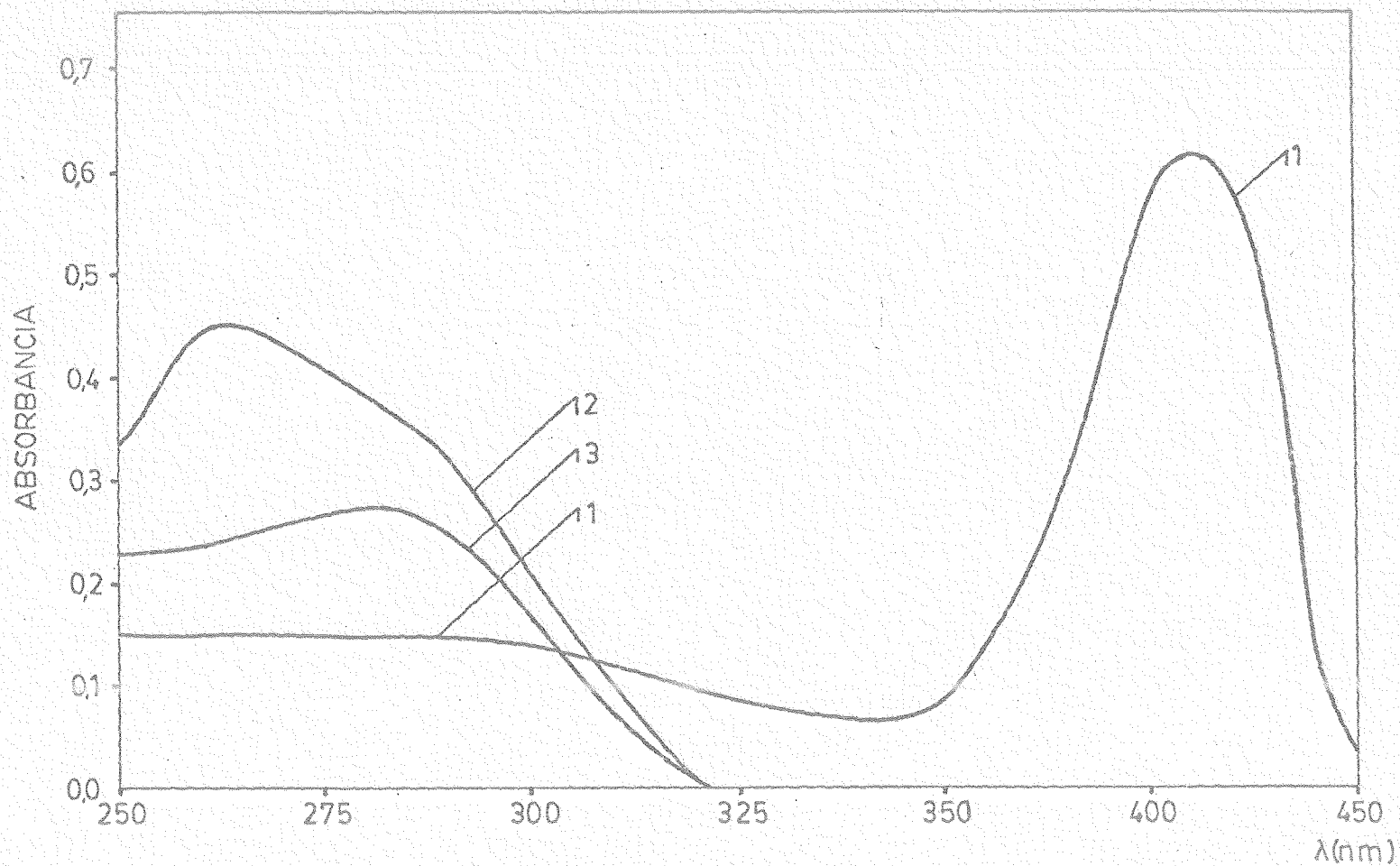
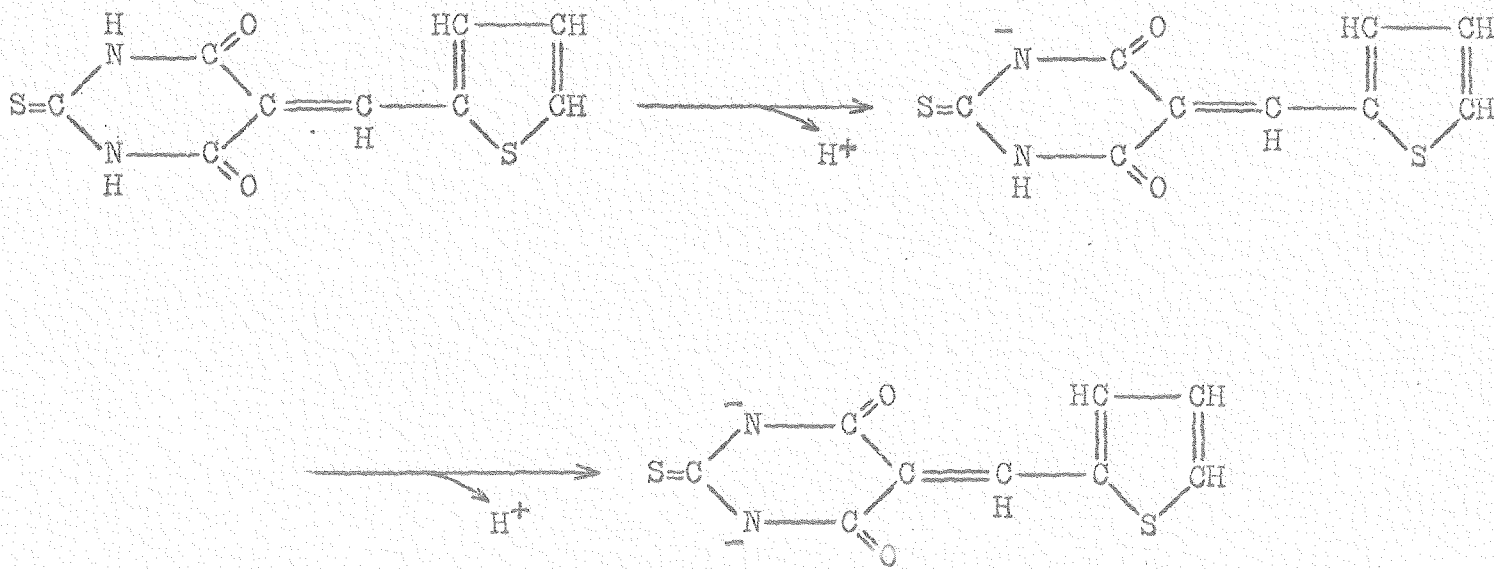


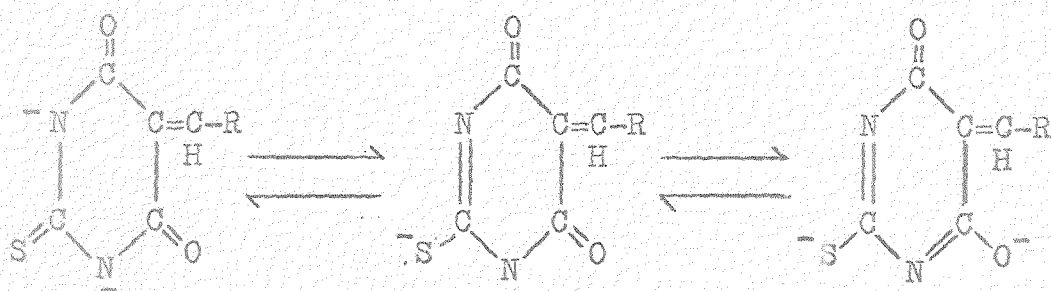
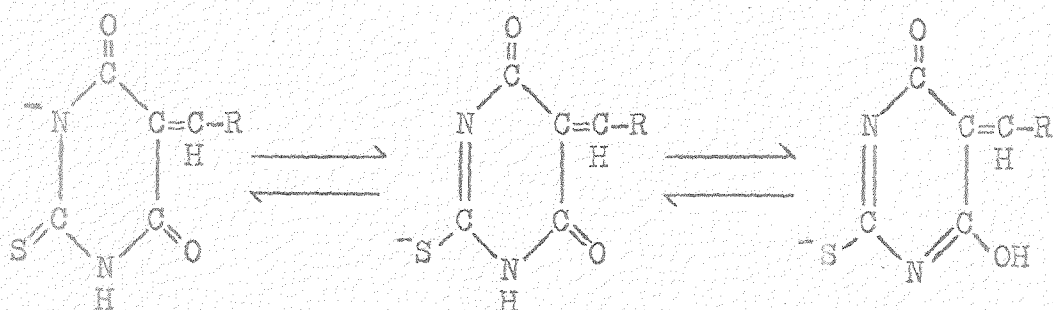
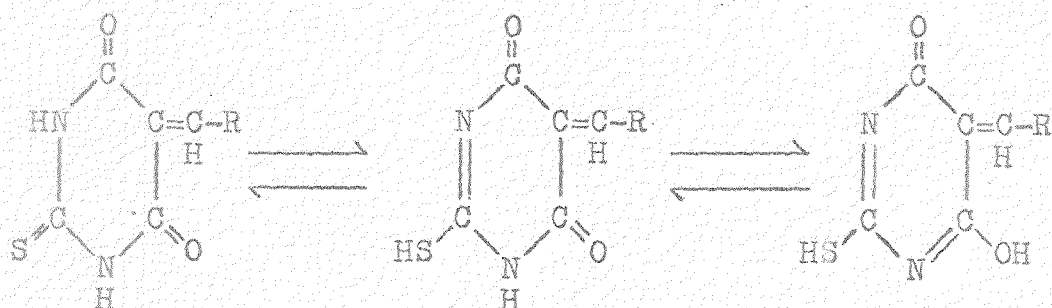
Fig.4.- Espectro U.V.-visible del TTB a distintos pH: 1.- 1,4; 2.- 6,8;
3.- 12,8

ESQUEMA 2

COMPORTAMIENTO DEL TTB EN DISOLUCION ACUOSA



ESQUEMA 2 (continuación)



I.4. CONSTANTE DE IONIZACIÓN

De acuerdo con el espectro U.V.-visible, puede suponerse la existencia de dos constantes de ionización para este compuesto, debidas a la desprotonización de los grupos -SH y -NH del nucleo del tiobarbitúrico.

Los procedimientos seguidos para determinar las constantes de ionización del TTb se basan en la medida simultánea del pH y la absorbancia. El pH se varía con disoluciones de NaOH y HCl de diversas concentraciones. El procedimiento a seguir es el siguiente:

TECNICA: En una célula de valoraciones fotométricas de 100 ml de capacidad y 4 cm de paso de luz, se dispone una determinada cantidad de TTb de manera que su concentración final sea de $1.0 \cdot 10^{-5}$ M, en un medio de acetona-agua 2 : 3 y se añade 2 ml de KCl 0,5 N, para ajuste de la fuerza iónica. Se introduce la célula en el aparato de valoraciones fotométricas y se le incorpora un agitador mecánico y un electrodo combinado de vidrio-calomelanos, conectado a un pH-metro de lectura digital. Partiendo de un medio fuertemente ácido, se varía paulatinamente el pH

con disoluciones de concentración adecuada de NaOH, de tal forma que el volumen final en la célula no exceda de 105 ml, lo que subondría un error máximo del 5% en la lectura de las absorbancias. Elegimos una longitud de onda de medición de 400 nm

En la Figura 5 representamos la variación de la absorbancia con el pH. Mediante el procedimiento de Hildebrand y Reilley (11) se calculan los puntos de inflexión en los que pH es igual a pK. En las Tablas III y IV y en la Figura 6 se recogen los datos y la representación gráfica, respectivamente.

Se han encontrado los valores de pK,

$$pK_1 = 6,43 \pm 0,10$$

$$pK_2 = 13,21 \pm 0,10$$

Hemos aplicado la correlación lineal en ambos casos. La pendiente y la ordenada en el origen fueron:

Para pK_1 : Pendiente= 1,186 Ordenada en el origen= -7,623

Para pK_2 : Pendiente= -4,44 Ordenada en el origen= 58,67

Estos valores obtenidos para las constantes de ionización están de acuerdo con los previstos para los barbitúricos en general (12). El descenso en el primer pK, con referencia a los tiobarbitúricos disustituídos en C-5, se puede explicar por la presencia del anillo de tiofén, anillo heterocíclico que conecta a través del doble enlace metínico con la imida cíclica, constituyéndose así un sistema que pre-

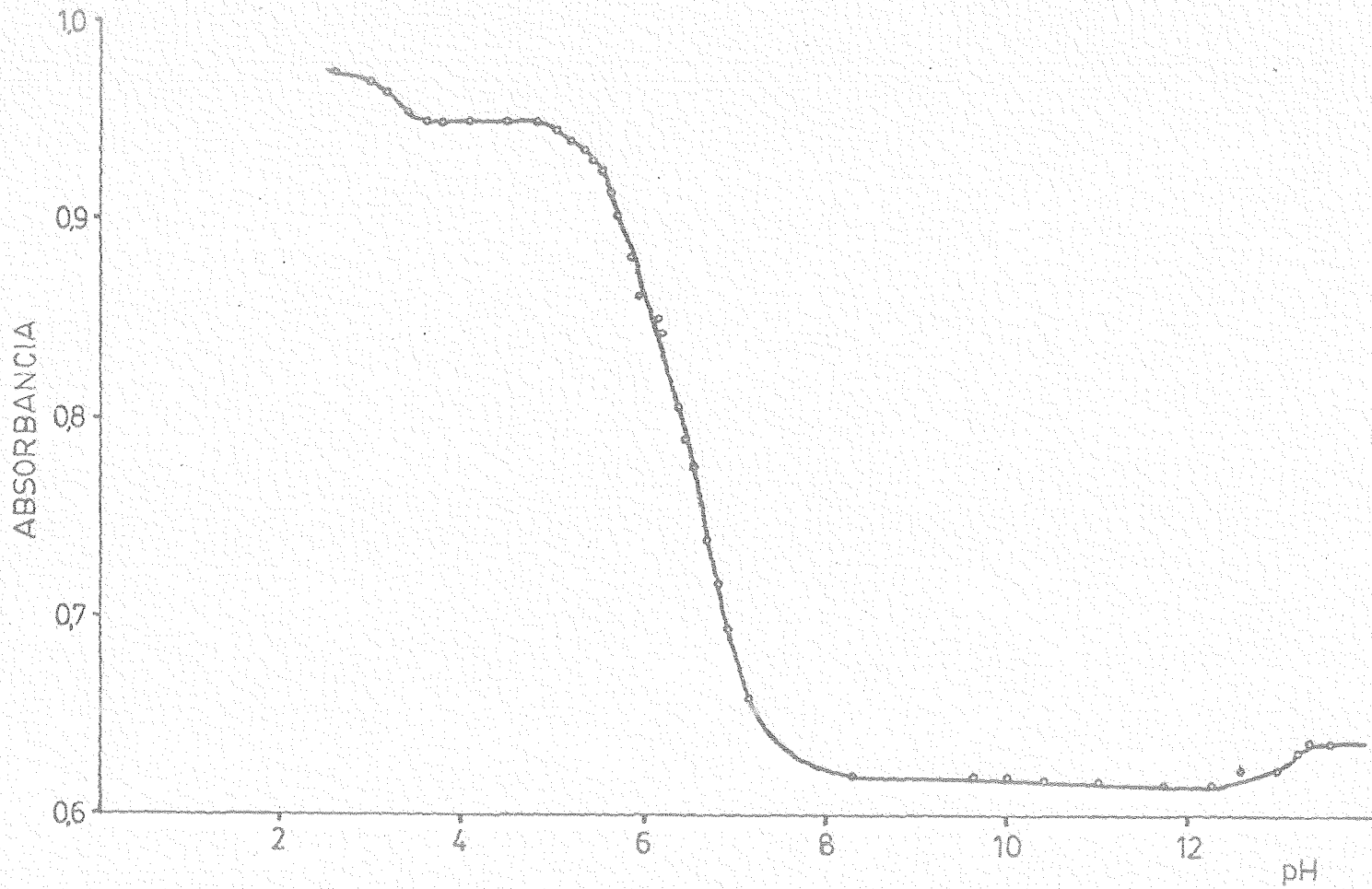


Fig.5.- Curva absorbancia-pH del TTB

TABLA III

DETERMINACION DE LA PRIMERA CONSTANTE DE IONIZACION (HILDEBRAND Y REILLEY)

pH	A_1	$A_2 - A_1$	$(A_2 - A_1)/A_1$	$\log (A_2 - A_1)/A_1$
5,5	0,305	0,025	0,082	-1,086
6,0	0,245	0,085	0,347	-0,460
6,5	0,165	0,165	1,000	0,000
7,0	0,060	0,270	4,500	0,653
7,5	0,015	0,315	21,000	1,322

TABLA IV

DETERMINACION DE LA SEGUNDA CONSTANTE DE IONIZACION (HILDEBRAND Y REILLEY)

pH	A_1	$A_2 - A_1$	$(A_2 - A_1)/A_1$	$\log (A_2 - A_1)/A_1$
13,0	0,002	0,018	9,00	0,95
13,1	0,004	0,016	4,00	0,60
13,2	0,010	0,010	1,00	0,00
13,3	0,015	0,005	0,33	-0,48
13,4	0,017	0,003	0,18	-0,75

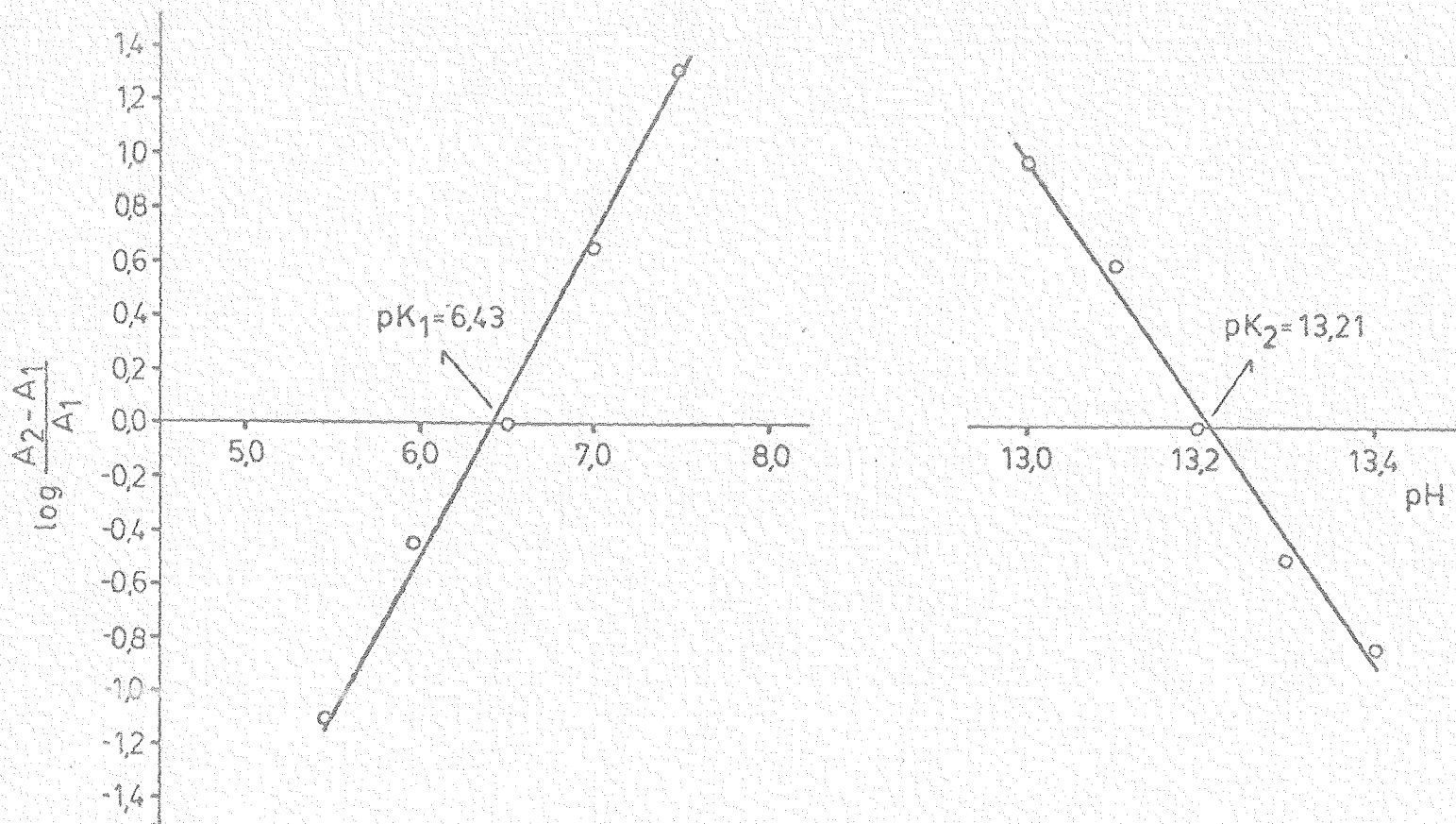
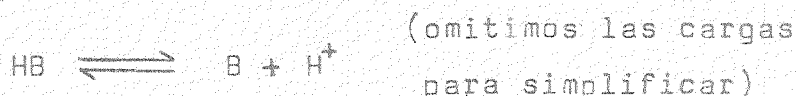


Fig.6.- Determinación de las constantes de ionización (Hildebrand y Reilley)

senta una mayor redistribución electrónica a través de toda la molécula, lo que origina un defecto de electrones en la proximidad del grupo tiol. En la segunda desprotonización, el pK es un poco mayor del que se da para los tiobarbitúricos disustituídos en C-5, y esto se explica por la mayor dificultad para "arrancar" un nuevo protón de un sistema posiblemente estabilizado a través de distintas formas mesoméricas.

Con el objeto de contrastar los resultados de pK obtenidos por el método de G.P. Hildebrand y C.N. Reilly, aplicamos el método riguroso de Sommer (13) y un tercer método, el de Hammet (14).

El método de Sommer se basa también en el estudio de las curvas absorbancia-pH. Sea un equilibrio ácido-base del tipo



cuya constante de equilibrio vendrá dada por:

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{B}]}{[\text{HB}]} \quad \text{(I)}$$

A una determinada acidez del medio corresponderá una absorbancia, que será suma de las absorbancias debidas a las especies en disolución, HB y B,

$$A = A_{\text{HB}} + A_{\text{B}} \quad \text{(II)}$$

Aplicando un balance de materia, tenemos

$$C_{\text{B}} = [\text{HB}] + [\text{B}] \quad \text{(III)}$$

Despejando HB de (I) y sustituyendo su valor en las expresiones (II) y (III) llegamos a la siguiente ecuación:

$$A = |B| \cdot \left[\epsilon_{HB} \cdot \frac{[H^+]}{K} + \epsilon_B \right] \quad (IV)$$

Efectuando cálculos análogos, llegamos a la expresión de C_B :

$$C_B = |B| \cdot \left[\frac{[H^+]}{K} + 1 \right] \quad (V)$$

despejando |B| de la expresión (V) y sustituyendo en (IV), obtenemos una nueva expresión para la absorbancia

$$A = \frac{C_B \cdot \left[\epsilon_{HB} \cdot \frac{[H^+]}{K} + \epsilon_B \right]}{\left(\frac{[H^+]}{K} + 1 \right)}$$

Reordenando términos,

$$\frac{C_B}{A} \cdot \epsilon_B = 1 + \frac{[H^+] \cdot (A - C_B \cdot \epsilon_{HB})}{K \cdot A}$$

dividiendo cada miembro por ϵ_B

$$\frac{C_B}{A} = \frac{1}{\epsilon_B} + \frac{[H^+] \cdot (A - C_B \cdot \epsilon_{HB})}{\epsilon_B \cdot K \cdot A} \quad (VI)$$

De igual forma, en (I) podríamos haber trabajado con el valor de $|B|$, y efectuando el mismo tipo de operaciones, obtendríamos la expresión

$$\frac{C_B}{A} = \frac{1}{\epsilon_{HB}} + \frac{K \cdot (A - C_B \cdot \epsilon_B)}{\epsilon_{HB} \cdot A \cdot |H^+|} \quad (\text{VII})$$

Por tanto, para cada equilibrio ácido-base particular contamos con dos expresiones, que nos permiten determinar el valor de la constante de ionización correspondiente.

De las ecuaciones reseñadas se desprende el conocimiento de los respectivos coeficientes de extinción molar, ϵ_{HB} y ϵ_B , de las especies en equilibrio para el cálculo de las constantes de ionización. Necesitamos pares de valores de A y $|H^+|$, que los obtenemos de las curvas $A=f(\text{pH})$. Allevados estos datos a las ecuaciones (VI) y (VII), y representando en ordenadas C_B/A y en abscisas $|H^+| \cdot (A - C_B \cdot \epsilon_{HB})/A$ ó $(A - C_B \cdot \epsilon_B)/A \cdot |H^+|$, se obtendrán dos rectas de pendientes

$$m_1 = 1/K \cdot \epsilon_B \qquad m_2 = K/\epsilon_{HB}$$

y de ordenadas en el origen

$$n_1 = 1/\epsilon_B \qquad n_2 = 1/\epsilon_{HB}$$

Por tanto, el valor de las constantes vendrá dado en cada caso por las expresiones:

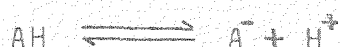
$$K_1 = n_1/m_1 \qquad K_2 = m_2/n_2$$

En las Tablas V y VI se detallan los resultados al aplicar estos cálculos a nuestros datos. Su representación gráfica se recoge en las Figuras 7 a 10. Los valores de los pK calculados según este método resultan ser

$$pK_1 = 6,50 \pm 0,10 \quad pK_2 = 13,17 \pm 0,10$$

Como se puede observar, los valores concuerdan muy bien con los calculados por el método de G.P. Hildebrand y C.N. Reilley.

Para la determinación del pK por el método de Hammett consideremos el ácido



de constante termodinámica

$$K_T = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{AH}}$$

A una determinada longitud de onda, la absorbancia de cada especie, ionizada y no ionizada, será:

$$A_{A^-} = \epsilon_{A^-} \cdot C_{A^-} \quad A_{AH} = \epsilon_{AH} \cdot C_{AH}$$

La absorbancia será, pues,

$$A = \epsilon \cdot C = \epsilon_{AH} \cdot C_{AH} + \epsilon_{A^-} \cdot C_{A^-}$$

A pH muy ácido solo existirá la forma no disociada, y será

$$A = \epsilon \cdot C = \epsilon_{AH} \cdot C_{AH}$$

y a pH muy básico,

$$A = \epsilon \cdot C = \epsilon_{A^-} \cdot C_{A^-}$$

DETERMINACION DE LA PRIMERA CONSTANTE DE IONIZACION (SOMMER)

$$\lambda = 400 \text{ nm}$$

$$c_B \cdot \epsilon_{H_2B} = 0,95$$

$$c_B \cdot \epsilon_{HB^-} = 0,62$$

pH	$ H^+ \cdot 10^6$	A	$\frac{c_B}{A} \cdot 10^5$	$\frac{(A - c_B \cdot \epsilon_{H_2B}) \cdot H^+ }{A}$	$\frac{(A - c_B \cdot \epsilon_{HB^-})}{A \cdot H^+ }$
5,50	3,16	0,925	1,08	$-0,85 \cdot 10^{-7} \circ$	$0,10 \cdot 10^6$
5,80	1,58	0,895	1,12	$-0,95 \cdot 10^{-7}$	$0,19 \cdot 10^6$
6,00	1,00	0,870	1,15	$-0,92 \cdot 10^{-7}$	$0,29 \cdot 10^6$
6,30	0,50	0,820	1,22	$-0,79 \cdot 10^{-7}$	$0,46 \cdot 10^6$
6,50	0,32	0,785	1,27	$-0,67 \cdot 10^{-7}$	$0,66 \cdot 10^6$
6,70	0,20	0,740	1,35	$-0,56 \cdot 10^{-7}$	$0,81 \cdot 10^6$
7,00	0,10	0,680	1,47	$-0,39 \cdot 10^{-7}$	$0,88 \cdot 10^6 \circ$

$$n = 1,69 \cdot 10^{-5}$$

$$m = 59,00$$

$$pK_1 = 6,54$$

$$n = 1,05 \cdot 10^{-5}$$

$$m = 0,36 \cdot 10^{-11}$$

$$pK_1 = 6,46$$

• Puntos eliminados tras haber realizado una representación gráfica

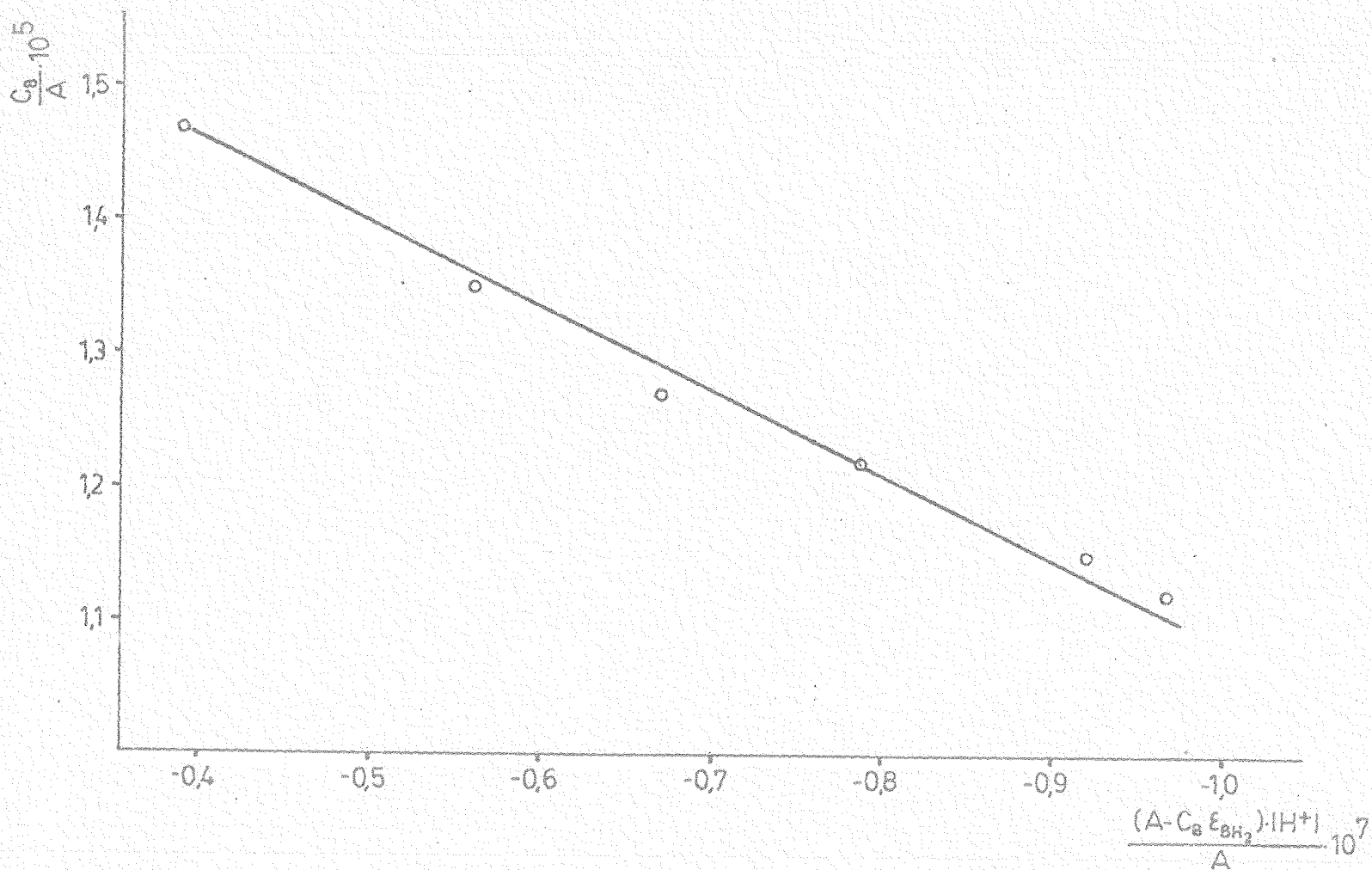


Fig.7.- Determinación de la primera constante de ionización (Sommer)

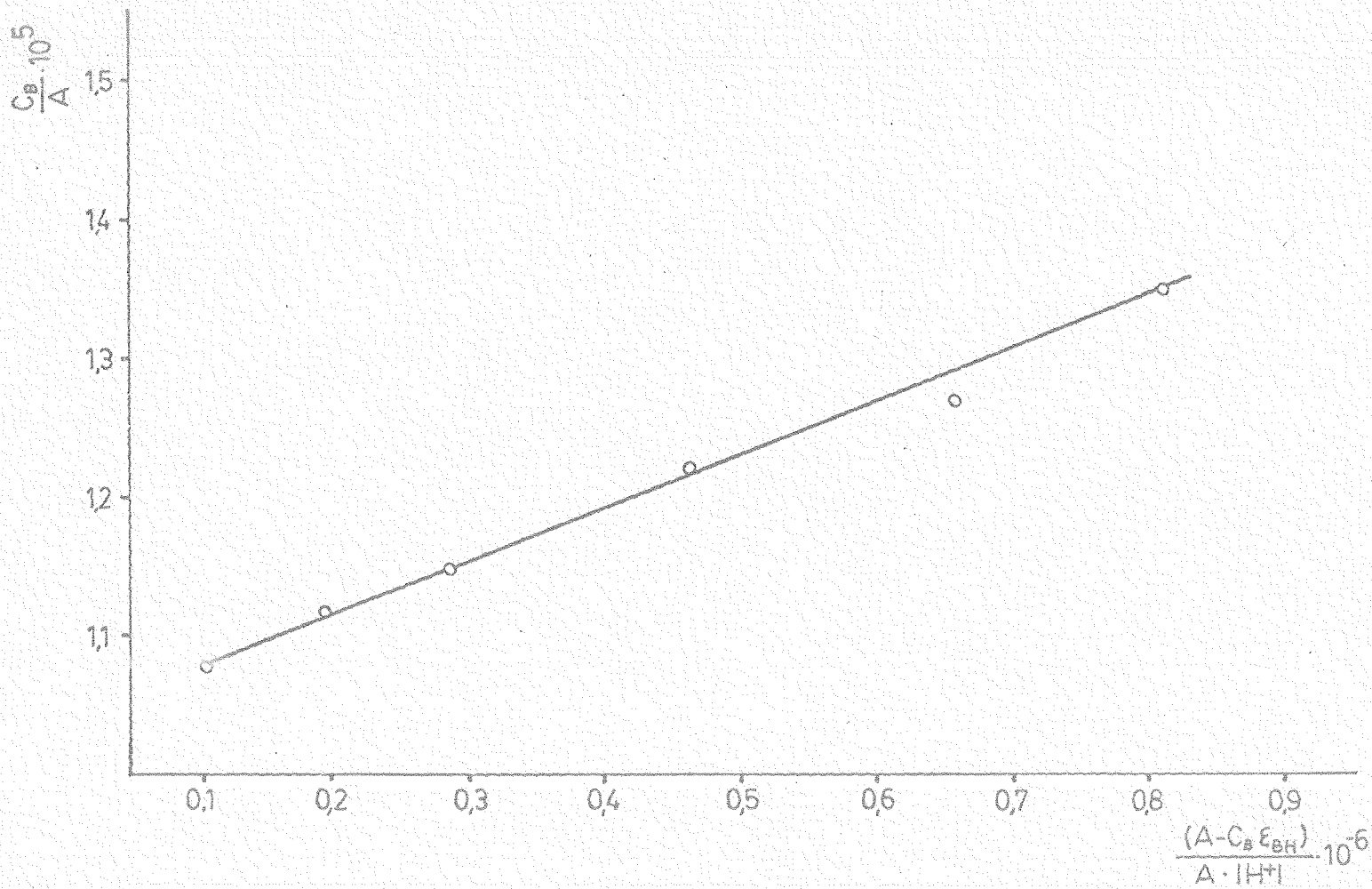


Fig.8.- Determinación de la primera constante de ionización (Sommer)

DETERMINACION DE LA SEGUNDA CONSTANTE DE IONIZACION (SOMMER)

$\lambda = 400 \text{ nm}$			$C_B \cdot \epsilon_{HB} = 0,62$	$C_B \cdot \epsilon_B = 0,64$	
pH	$ \text{H}^+ \cdot 10^{13}$	A	$\frac{C_B}{A} \cdot 10^5$	$\frac{(A - C_B \cdot \epsilon_{HB}) \cdot \text{H}^+ }{A}$	$\frac{(A - C_B \cdot \epsilon_B)}{A \cdot \text{H}^+ }$
13,00	1,00	0,622	1,6077	$0,321 \cdot 10^{-15}$	$-2,894 \cdot 10^{11} \circ$
13,10	0,79	0,624	1,6026	$0,509 \cdot 10^{-15}$	$-3,229 \cdot 10^{11}$
13,20	0,63	0,630	1,5873	$1,000 \cdot 10^{-15}$	$-2,516 \cdot 10^{11}$
13,30	0,50	0,635	1,5748	$1,183 \cdot 10^{-15}$	$-1,572 \cdot 10^{11}$
13,40	0,40	0,637	1,5699	$1,062 \cdot 10^{-15} \circ$	$-1,183 \cdot 10^{11}$
	$n = 1,62 \cdot 10^{-5}$			$n = 1,55 \cdot 10^{-5}$	
	$m = 3,62 \cdot 10^8$			$m = -1,60 \cdot 10^{-18}$	
	$\text{pK}_2 = 13,35$			$\text{pK}_2 = 12,99$	

◦ Puntos eliminados tras haber realizado una representación gráfica

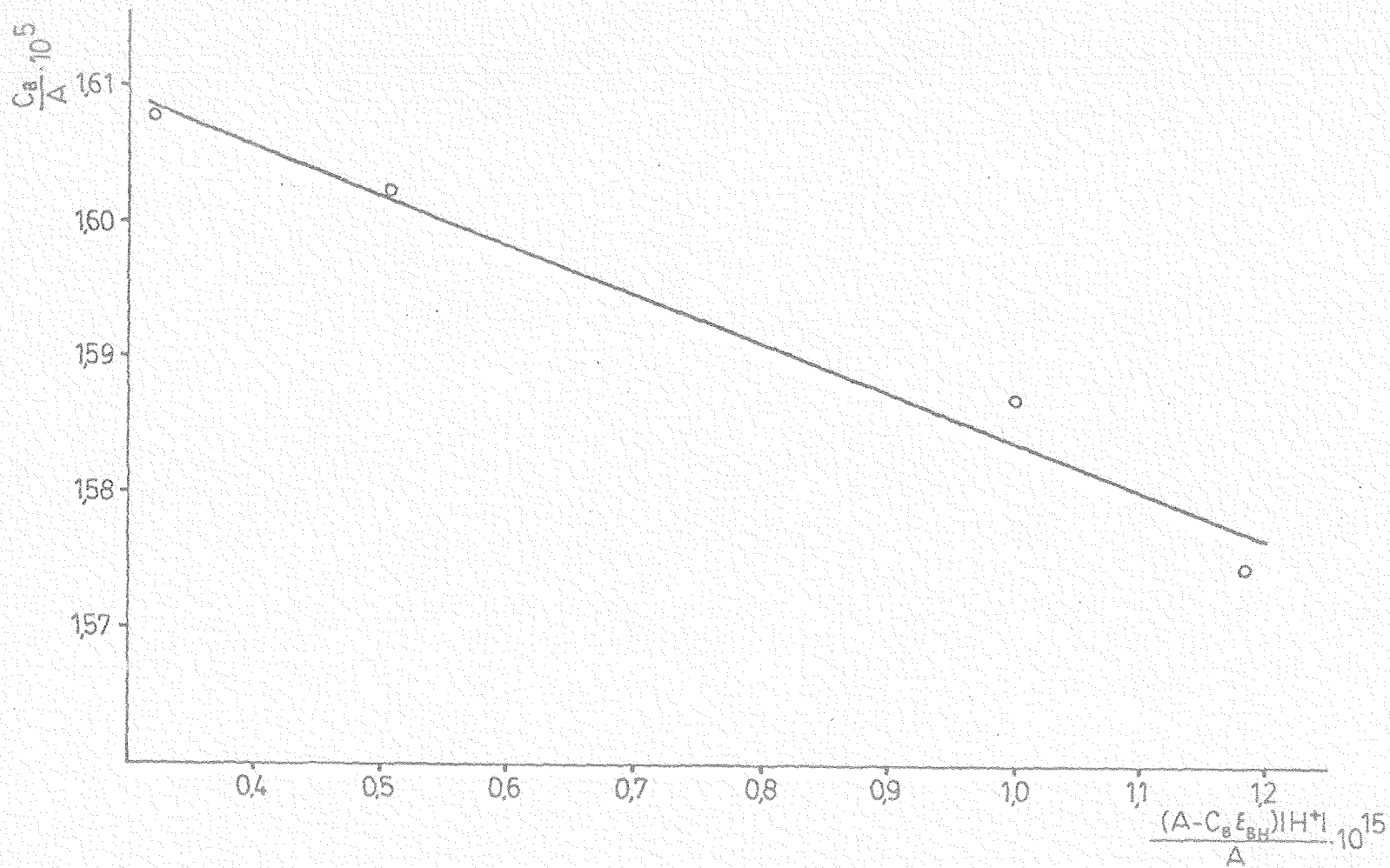


Fig.9.- Determinación de la segunda constante de ionización (Sommer)

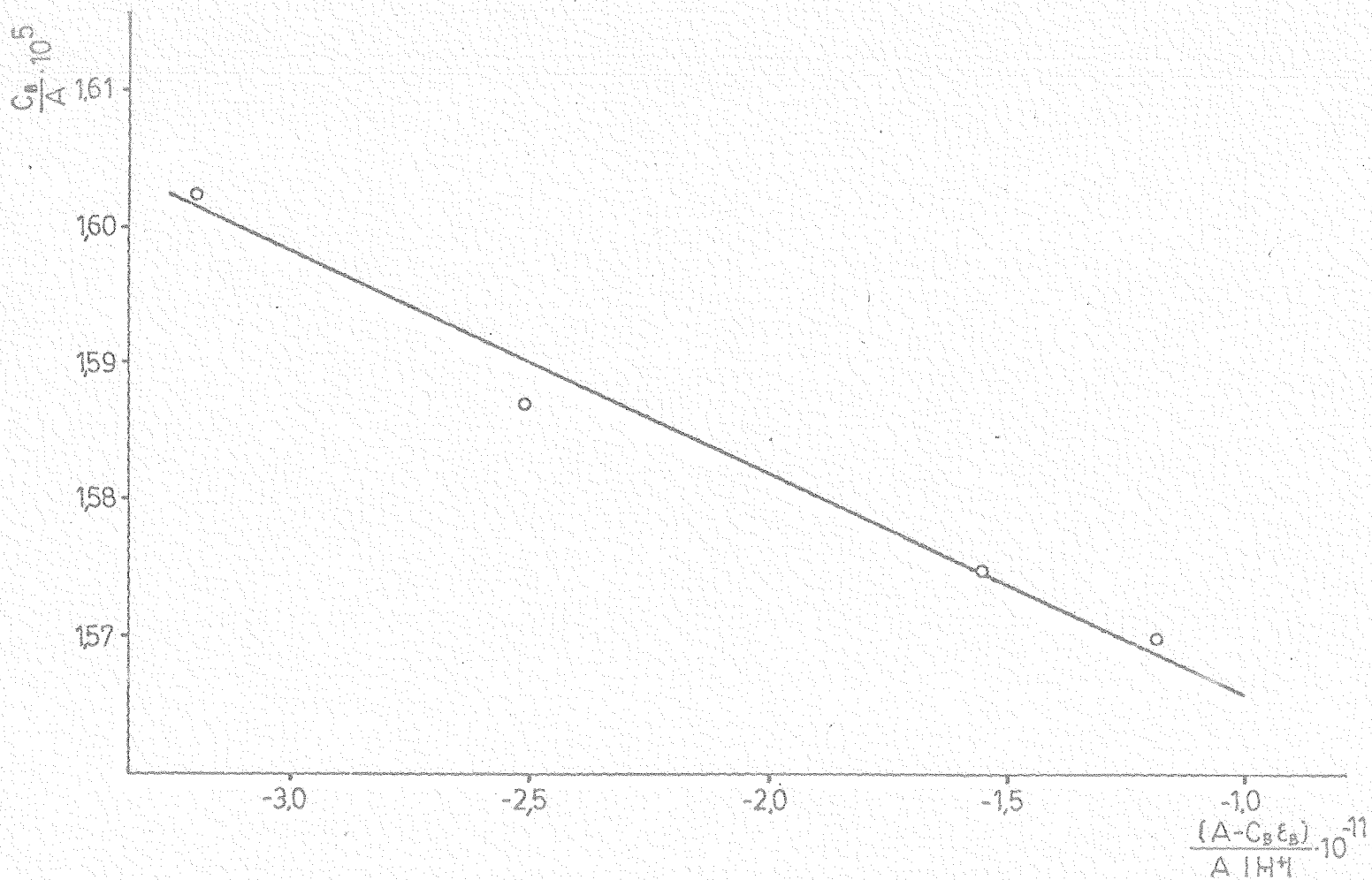


Fig.10.- Determinación de la segunda constante de ionización (Sommer)

Según se puede demostrar, la constante de acidez de Hammett H_o (análogo al pH) es:

$$H_o = pK_T - \log \frac{C_{AH}}{C_A} = pK_T - \log \frac{\epsilon - \epsilon_{A^-}}{\epsilon_{AH} - \epsilon}$$

despejando K_T queda,

$$K_T = 10^{-pK_T} = 10^{-H_o} \cdot \log \frac{\epsilon_{AH} - \epsilon}{\epsilon - \epsilon_{A^-}} = h_o \cdot \frac{\epsilon_{AH} - \epsilon}{\epsilon - \epsilon_{A^-}}$$

por lo tanto,

$$\frac{1}{K_T} = \frac{\epsilon}{h_o \cdot (\epsilon_{AH} - \epsilon)} - \frac{\epsilon_{A^-}}{h_o \cdot (\epsilon_{AH} - \epsilon)}$$

Si consideramos

$$x = \frac{1}{h_o \cdot (\epsilon_{AH} - \epsilon)} \quad ; \quad y = \epsilon \cdot x$$

nos queda

$$\frac{1}{K_T} = y - \epsilon_{A^-} \cdot x$$

o sea,

$$y = \frac{1}{K_T} + \epsilon_{A^-} \cdot x$$

Se representan los valores de "x" frente a los de "y". Para hallar "x" conocemos $h_o = 10^{-H_o}$, aproximadamente igual a 10^{-pH} en soluciones suficientemente diluídas;-- conocemos ϵ de $A = \epsilon \cdot C$ ($C = 10^{-5} M$) y conocemos ϵ_{AH} de $A_{AH} =$

$$= \epsilon_{AH} \cdot C_{AH} \text{ (a pH suficientemente ácido).}$$

Por el método de los mínimos cuadrados calculamos las constantes a partir de las gráficas respectivas.

En las Tablas VII y VIII se muestran los resultados obtenidos al aplicar estos cálculos a nuestros datos, y en las Figuras 11 y 12 se expone su representación gráfica. Los valores de los pK calculados según este método han sido:

$$pK_1 = 6,52 \pm 0,10 \quad ; \quad pK_2 = 13,46 \pm 0,10$$

DETERMINACION DE LA PRIMERA CONSTANTE DE IONIZACION (HAMMET)

$$\epsilon_{H_2B} = A_{H_2B}/C_{H_2B} = 9,5 \cdot 10^4$$

pH	$h_0 \cdot 10^7$	A	$\epsilon \cdot 10^4$	$\frac{1}{h_0 \cdot (\epsilon_{H_2B} - \epsilon)}$	$\frac{\epsilon}{h_0 \cdot (\epsilon_{H_2B} - \epsilon)}$
5,0	100,0	0,940	9,40	$1,00 \cdot 10^2$	$9,4 \cdot 10^6$
5,8	16,0	0,900	9,00	$1,26 \cdot 10^2$	$11,4 \cdot 10^6$
6,0	10,0	0,870	8,70	$1,25 \cdot 10^2$	$10,9 \cdot 10^6$
6,2	6,3	0,840	8,40	$1,40 \cdot 10^2$	$12,1 \cdot 10^6$
6,5	3,2	0,780	7,80	$1,86 \cdot 10^2$	$14,5 \cdot 10^6$
6,7	2,0	0,750	7,50	$2,51 \cdot 10^2$	$18,8 \cdot 10^6$
7,0	1,0	0,680	6,80	$3,70 \cdot 10^2$	$25,2 \cdot 10^6$
7,3	0,5	0,650	6,50	$6,66 \cdot 10^2$	$43,2 \cdot 10^6$
7,5	0,3	0,635	6,35	$10,00 \cdot 10^2$	$63,7 \cdot 10^6$
7,7	0,2	0,630	6,30	$15,70 \cdot 10^2$	$98,7 \cdot 10^6$

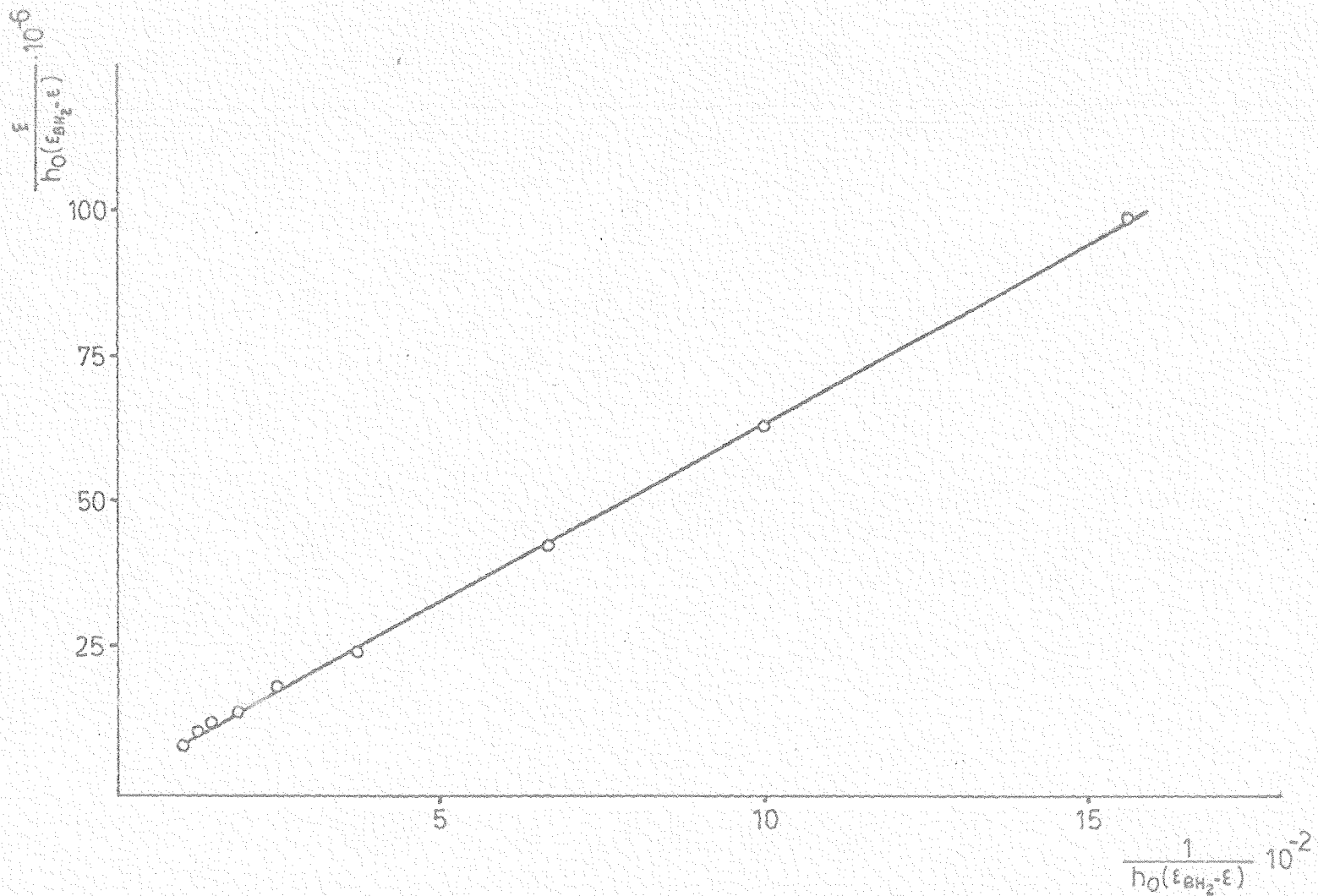


Fig.11.- Determinación de la primera constante de ionización (Hammet)

TABLA VIII

DETERMINACION DE LA SEGUNDA CONSTANTE DE IONIZACION (HAMILT)

$$\epsilon_{HB} = A_{HB}/C_{HB} = 6,2 \cdot 10^4$$

pH	$h_0 \cdot 10^{14}$	A	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	$\frac{1}{h_0 \cdot (\epsilon - \epsilon_{HB})}$	$\frac{\epsilon}{h_0 \cdot (\epsilon - \epsilon_{HB})}$
13,0	10,0	0,622	6,22	$5,0 \cdot 10^{10}$	$31,1 \cdot 10^{14}$
13,1	7,9	0,624	6,24	$3,2 \cdot 10^{10}$	$19,7 \cdot 10^{14}$
13,2	6,3	0,630	6,30	$1,6 \cdot 10^{10}$	$10,1 \cdot 10^{14}$
13,3	5,0	0,635	6,35	$1,3 \cdot 10^{10}$	$8,3 \cdot 10^{14}$
13,4	4,0	0,637	6,37	$1,5 \cdot 10^{10}$	$9,6 \cdot 10^{14}$

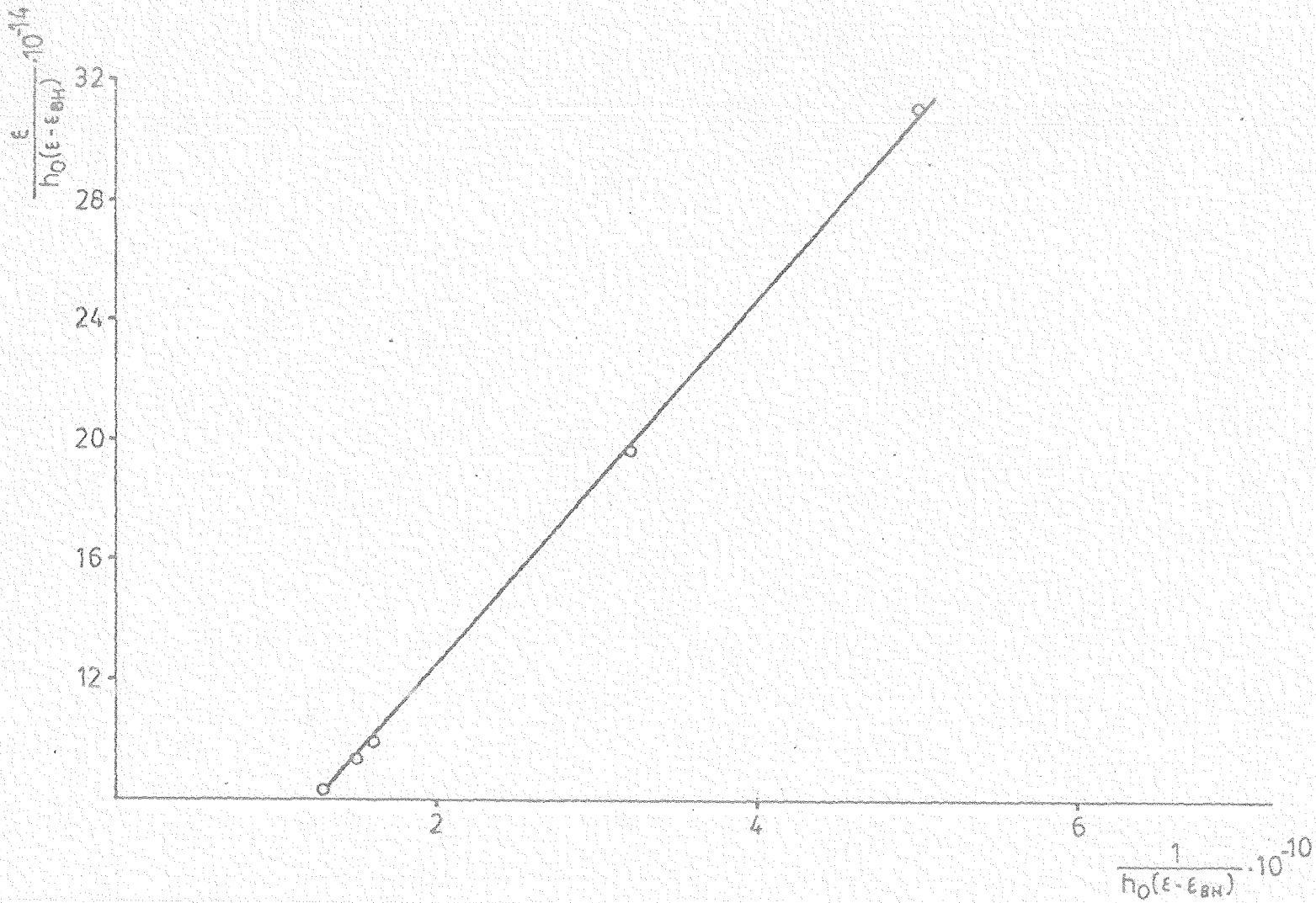


Fig.12.- Determinación de la segunda constante de ionización (Hammett)

1.5. ZONAS DE EXISTENCIA DE LAS DIVERSAS FORMAS DEL TTB EN DISOLUCION

Se determinan en este apartado las zonas teóricas de existencia de las diversas especies del TTB en disolución frente al pH. Esto se consigue a partir de los valores experimentales de las constantes de ionización, determinadas por los métodos anteriores (utilizamos un valor medio de las mismas).

Se deduce que las tres formas posibles del TTB en disolución (H_2B , HB^- y B^{2-}) varían proporcionalmente con el pH de la disolución en que se encuentran. Es conveniente determinar las zonas en que existe preferentemente cada una de las especies, debido a su especial importancia al abordar el estudio de su extracción con disolventes orgánicos, así como para ver qué forma predominará a pH fisiológico. Para ello, representamos la variación del logaritmo de la concentración ($\log C$), en ordenadas, frente al pH, en abscisas, para cada una de las especies citadas. Esta representación es el resultado de un cálculo teórico a partir de los valores experimentales obtenidos de K_1 y K_2 :

$$K_1 = \frac{|HB^-| \cdot |H^+|}{|H_2B|} = 3,2 \cdot 10^{-7}$$

$$K_2 = \frac{|B^{2-}| \cdot |H^+|}{|HB^-|} = 5,0 \cdot 10^{-14}$$

El balance de materia será:

$$C_a = [H_2B] + [HB^-] + [B^{=}]$$

de esta última expresión deducimos

$$\alpha_0 = \frac{[H_2B]}{C_a} = \frac{1}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 \cdot K_2}{[H^+]^2}}$$

y a partir de este sistema de ecuaciones podemos expresar cada una de las concentraciones en el equilibrio en función de la variable principal, $[H^+]$:

$$[H_2B] = C_a \cdot \alpha_0$$

$$[HB^-] = C_a \cdot \alpha_0 \cdot K_1 \cdot [H^+]^{-1}$$

$$[B^{=}] = C_a \cdot \alpha_0 \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^{-2}$$

Cada expresión puede representarse gráficamente, en un diagrama $\log C = f(\text{pH})$, dándole valores a $[H^+]$ de forma paulatina y sistemática. Sin embargo, es posible efectuar una representación aproximada, sin más que tener en cuenta el término del polinomio del denominador de α_0 que tiene mayor valor en una zona dada.

- Para la zona de $[H^+] > K_1$, el término unidad del denominador de α_0 es mucho mayor que los demás; luego, tenemos:

$$\log [H_2B] = \log C_a$$

$$\log [HB^-] = \log C_a - pK_1 + pH$$

$$\log [B^{=}] = \log C_a - pK_1 - pK_2 + 2 \cdot pH$$

- Cuando $[H^+] = K_1$, el valor de α_0 es 1/2:

$$\log [H_2B] = \log C_a - 0,3$$

$$\log [HB^-] = \log C_a - 0,3$$

$$\log [B^{=}] = \log C_a + pK_1 - pK_2 - 0,3$$

- Para el rango $K_1 > [H^+] > K_2$, predomina en el denominador de α_0 $K_1 \cdot [H^+]^{-1}$, y

$$\log [H_2B] = \log C_a + pK_1 - pH$$

$$\log [HB^-] = \log C_a$$

$$\log [B^{=}] = \log C_a - pK_2 + pH$$

- Cuando $[H^+] = K_2$ hay que considerar los dos últimos términos del denominador:

$$\alpha_0 = \frac{1}{2 \cdot K_1 / K_2}$$

$$\log |H_2B| = \log C_a + pK_1 - pK_2 - 0,3$$

$$\log |HB^-| = \log C_a - 0,3$$

$$\log |B^{=}| = \log C_a - 0,3$$

- Para $|H^+| < K_2$ predomina $K_1 \cdot K_2 \cdot |H^+|^{-2}$ en el denominador de α_0 y por lo tanto:

$$\log |H_2B| = \log C_a + pK_1 + pK_2 - 2 \text{ pH}$$

$$\log |HB^-| = \log C_a + pK_2 - \text{pH}$$

$$\log |B^{=}| = \log C_a$$

La representación gráfica obtenida según estos criterios, para cada especie, se recoge en la Figura 13. Se deduce fácilmente que la forma H_2B existe preferentemente en el intervalo de pH 0 a 6,5; la HB^- entre 6,5 y 13,3; y la $B^{=}$ desde 13,3 en adelante.

Otra manera de ver las zonas de existencia de las distintas formas de un ácido en disolución consiste en - representar las fracciones molares frente al pH.

La concentración total del ácido será:

$$C_a = |H_2B| + |HB^-| + |B^{=}| = |H_2B| + \frac{|H_2B| \cdot K_1}{|H^+|} + \frac{|H_2B| \cdot K_1 \cdot K_2}{|H^+|^2} =$$

$$= \frac{|H_2B| \cdot [|H^+|^2 + K_1 \cdot |H^+| + K_1 \cdot K_2]}{|H^+|^2}$$

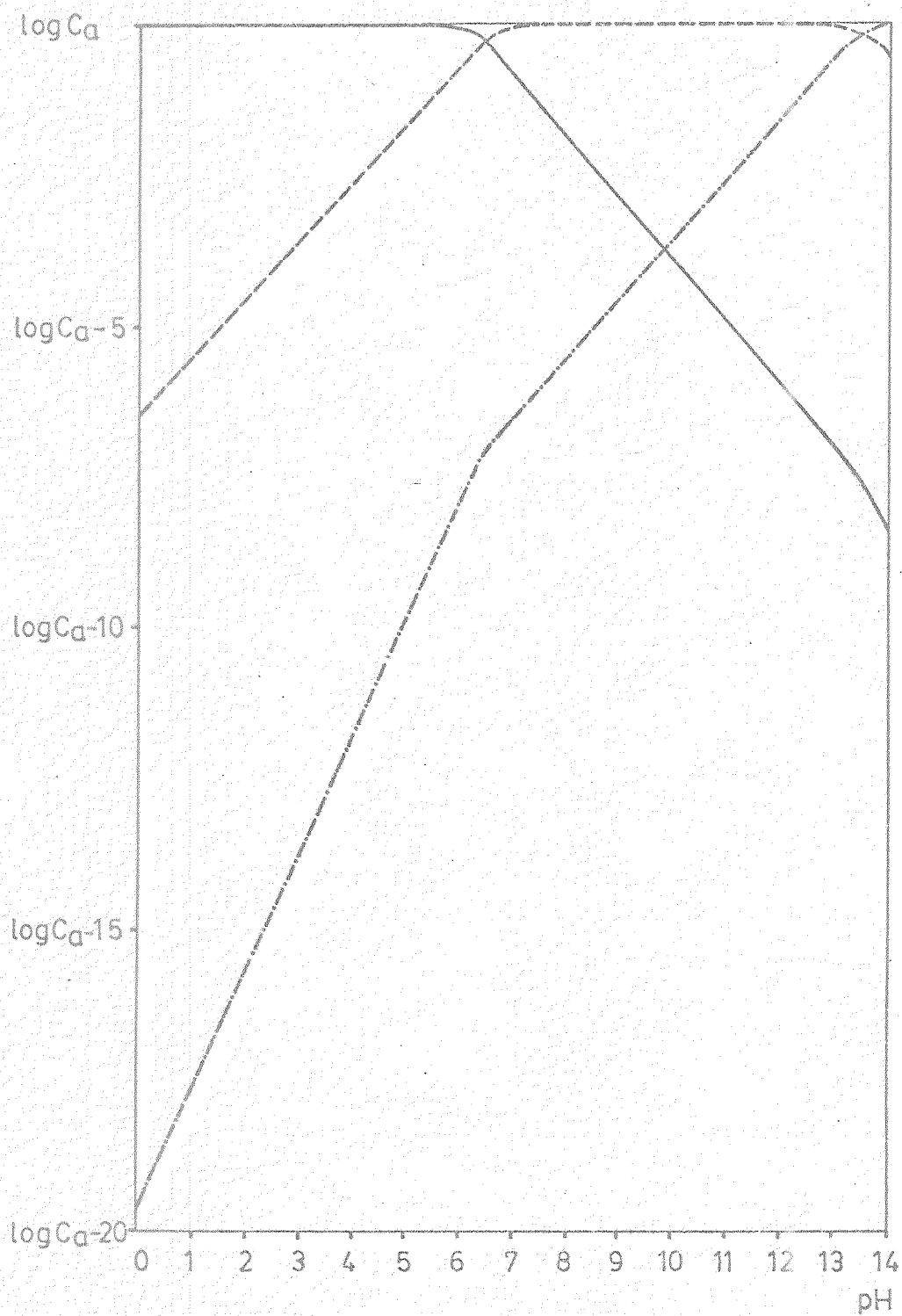


Fig.13.- Diagrama de la variable fundamental:
 (—) H_2B ; (---) HB^- ; (-·-·-) B^{2-}

Podemos ahora calcular fácilmente las expresiones de las fracciones molares de las especies H_2B (α_0), HB^- (α_1) y $B^{=}$ (α_2):

$$\alpha_0 = \frac{[H_2B]}{C_a} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + K_1 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2}$$

$$\alpha_1 = \frac{[HB^-]}{C_a} = \frac{K_1 \cdot [H^+]}{[H^+]^2 + K_1 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2}$$

$$\alpha_2 = \frac{[B^{=}] }{C_a} = \frac{K_1 \cdot K_2}{[H^+]^2 + K_1 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2}$$

Para construir la gráfica $\alpha = f(\text{pH})$ para cada especie basta con dar valores de $[H^+]$ a cada una de las expresiones algebraicas de las fracciones molares deducidas anteriormente, dibujando primero los llamados "puntos del sistema", que son aquellos en que el pH se iguala al valor del pK, y en los cuales, las concentraciones de las dos especies implicadas en la correspondiente constante se igualan, siendo las fracciones molares igual a 0,5.

En la Figura 14 se representan las fracciones molares de cada especie del TTB en función del pH, observándose se que existen zonas de predominio para cada especie separadas entre sí por los puntos del sistema.

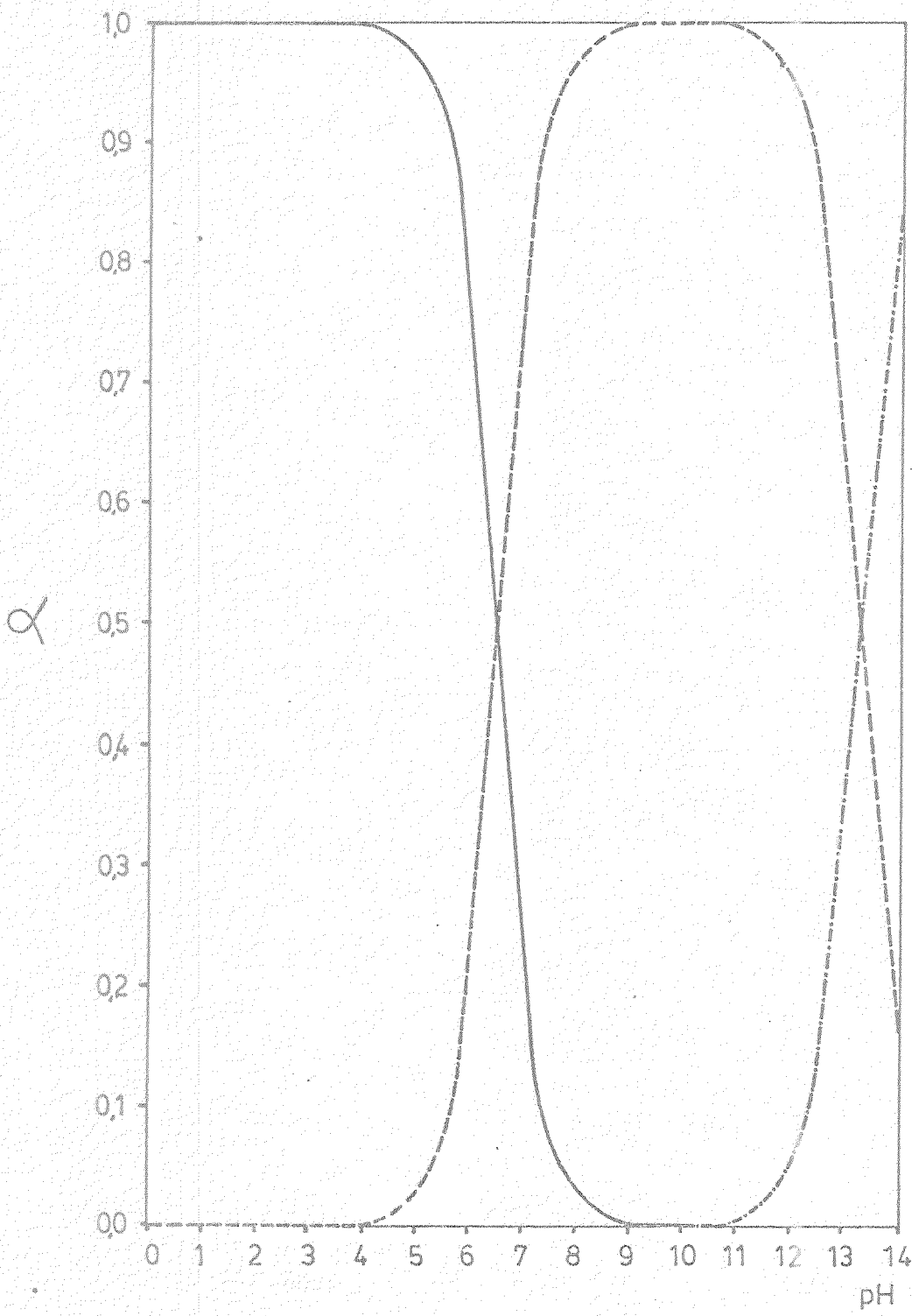


Fig.14.- Diagrama de distribución: (—) H_2B ;
 (---) HB^- ; (-·-·-) B^-

1.6. ESTABILIDAD

Llevamos a cabo una serie de estudios espectrofotométricos y térmicos con objeto de comprobar la estabilidad del TTB en disolución en distintos medios y también en estado sólido.

1.6.1. Estabilidad a distintos pH

Para desarrollar este estudio de estabilidad empleamos la siguiente técnica:

TECNICA: En matraces aforados de 10 ml de capacidad se ponen 0,1 ml de disolución de TTB en DMF de concentración apropiada, y se enrasan con la disolución reguladora del pH adecuada. Se mide la absorbancia de estas disoluciones frente a un blanco agua-DMF 99:1, a distintas longitudes de onda.

1.6.1.1. Estabilidad en medio ácido fuerte

Siguiendo la técnica descrita más arriba, preparamos disoluciones de TTB $2,0 \cdot 10^{-5}$ M en medio clorhídrico, a pH 1. Registramos periódicamente el espectro de absorción (Figura 15), del cual deducimos una desestabilización inicial que a los 15 minutos parece tornarse por una estabilización, decreciendo posteriormente la absorbancia a 412 nm de forma

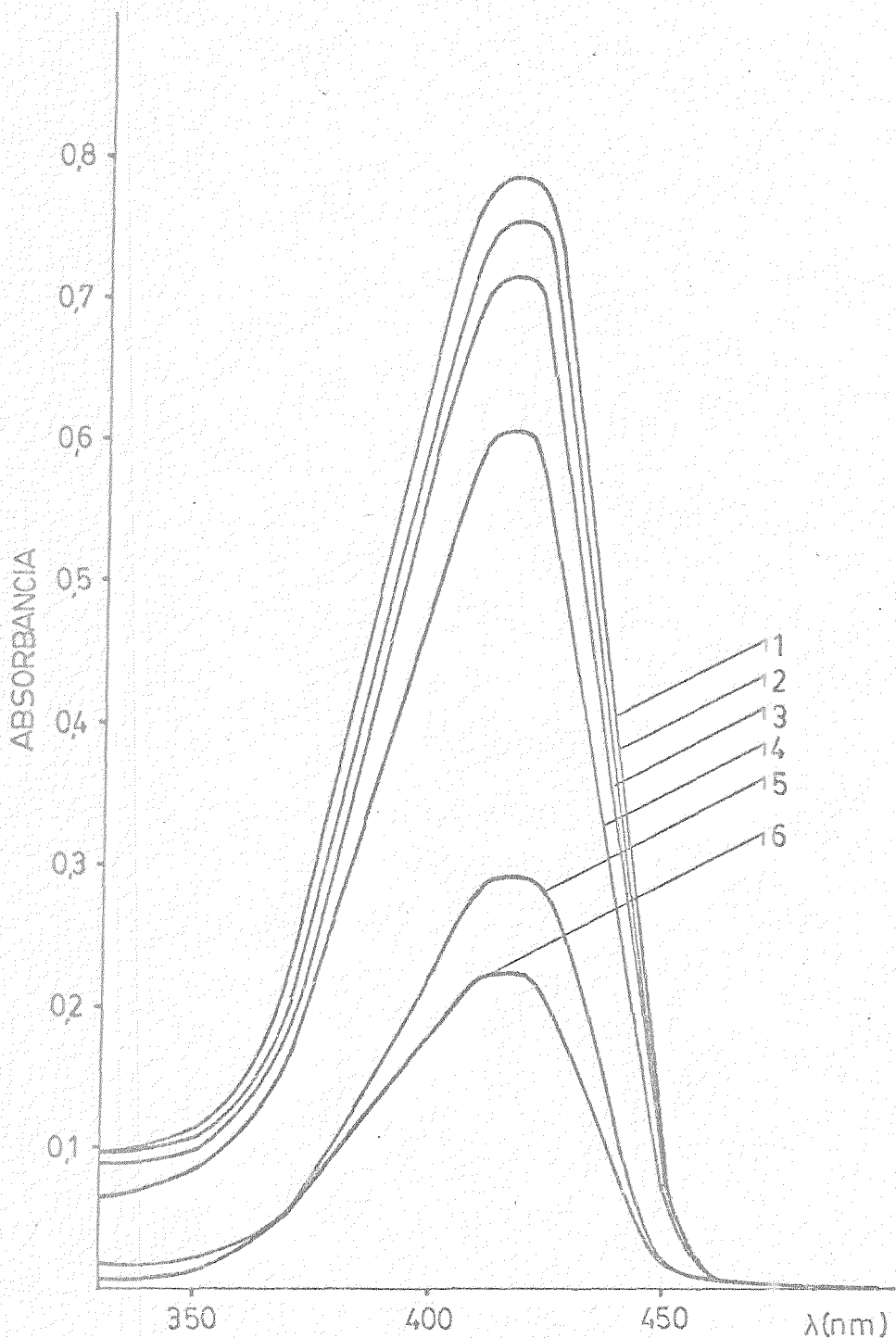


Fig.15.- Estabilidad en medio ácido fuerte: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 15 min.; 3.- a los 60 min.; 4.- a los 150 min.; 5.- a las 17 hr.; 6.- a las 24 hr.

gradual y constante. A las 24 horas el decrecimiento es de un 70%.

I.6.1.2. Estabilidad en medio débilmente ácido

Siguiendo la técnica establecida, medimos periódicamente la absorbancia de disoluciones $2,0 \cdot 10^{-5}$ M de TTB en un medio regulador acético-acetato de pH 4,75 (Figura 16).

Deducimos que, en estas condiciones, las disoluciones permanecen estables durante los primeros 15 minutos, y a partir de aquí, se produce una disminución gradual de la absorbancia a 412 nm, más ostensible que en medio ácido fuerte. A las 24 horas, el decrecimiento de la absorbancia es del 84%.

I.6.1.3. Estabilidad en medio neutro

Siguiendo la misma técnica, procedimos al registro periódico de la absorbancia de disoluciones $4,0 \cdot 10^{-5}$ M de TTB en medio neutro, utilizando un tampón fosfato de pH 6,8 (Figura 17).

Se observa que las disoluciones son bastante estables en estas condiciones, mostrando un lento incremento de la absorbancia a 260 nm, que alcanza su máximo a los dos días (7%), disminuyendo posteriormente.

I.6.1.4. Estabilidad en medio alcalino

Del mismo modo, medimos periódicamente la absorbancia de disoluciones $4,0 \cdot 10^{-5}$ M de TTB a pH 11,8, conse-

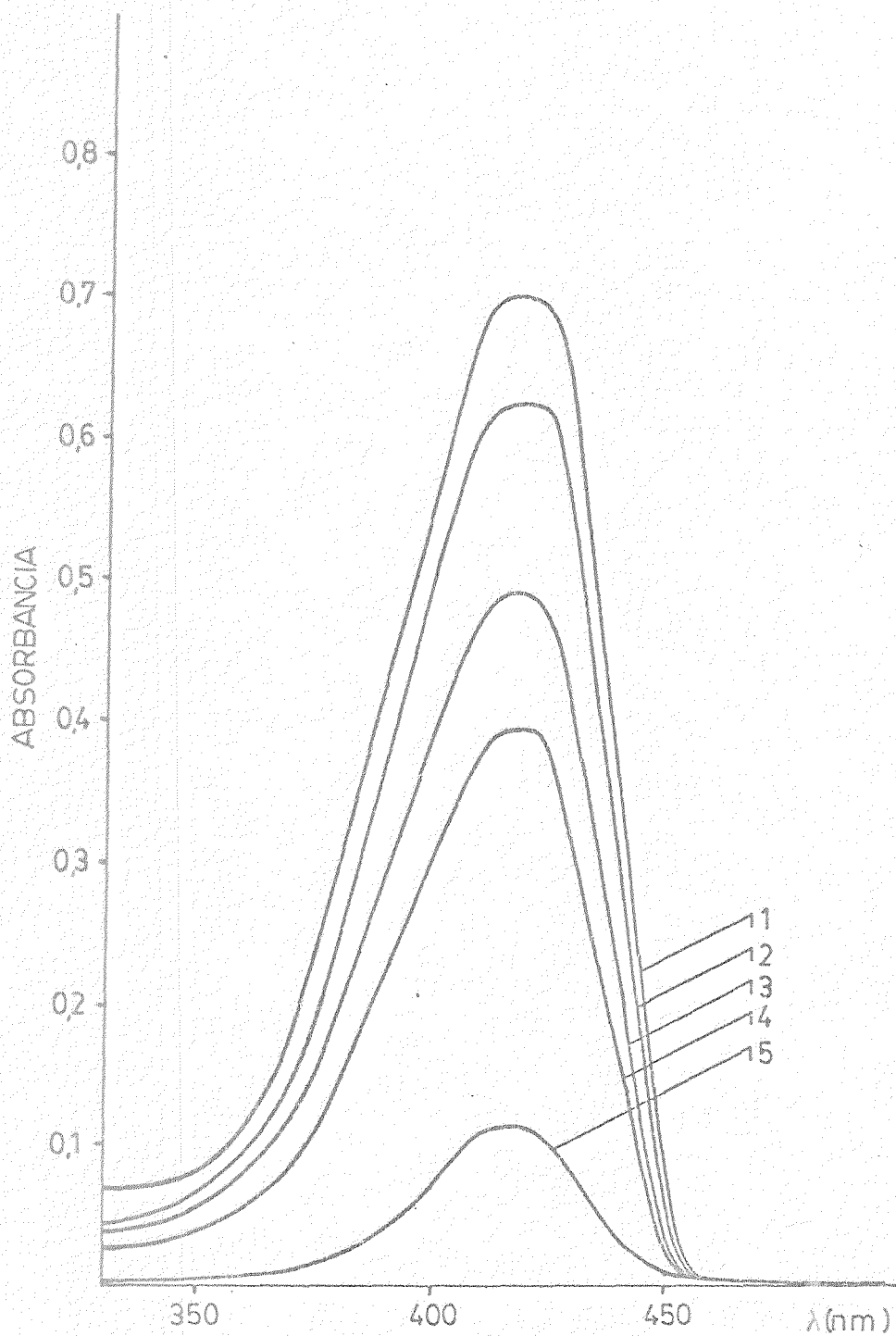


Fig.16.- Estabilidad en medio ácido débil: 1.- a los 5 y a los 15 min.; 2.- a los 90 min.; 3.- a las 4 hr.; 4.- a las 6 hr.; 5.- a las 24 hr.

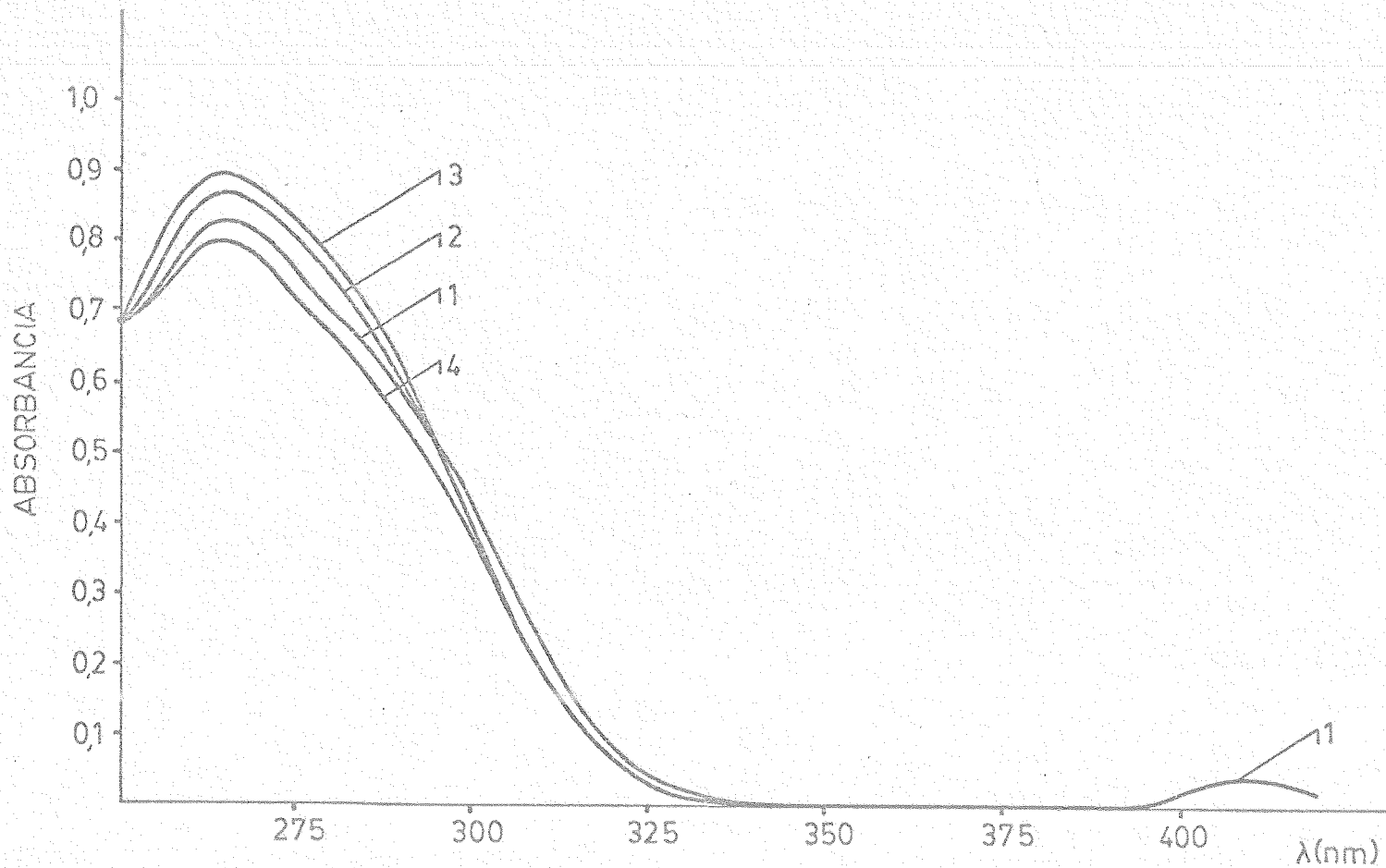


Fig.17.- Estabilidad en medio neutro: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 30 min. y a las 3 hr.; 3.- a los 2 días; 4.- a los 5 días

guido mediante NaOH 0,01 N (Figura 18).

Se observa la formación de un máximo de absorción a 265 nm, que llega a superar al de 285 nm, el cual aumenta más lentamente. A partir del segundo día, en que se alcanza la máxima absorbancia (58% de incremento a 265 nm) disminuyen lentamente ambos máximos.

1.6.2. Estabilidad térmica

Procedemos al ensayo de la estabilidad térmica en estufa. Para ello, se pesan exactamente entre 0,2 y 0,3 gramos de TTB, que se introducen en la estufa, y se procede al calentamiento a temperatura y tiempo variables, que van desde los 110 a los 200°C, y desde los 5 minutos a las 3 horas, respectivamente. A continuación, pasamos al desecador, hasta que toma la temperatura ambiente, y se somete la muestra a la pesada en balanza analítica. Después de la primera pesada, se introduce nuevamente en la estufa, se lleva al desecador, se pesa, y así sucesivamente hasta obtener pesada constante.

De los resultados de este estudio, que se expresan en la Tabla IX, se desprende que el TTB es estable a 110 y 150°C, temperaturas a las cuales sólo tiene lugar la lógica pérdida de agua, pero a 200°C el compuesto pierde algo más de peso, por descomponerse ligeramente.

1.6.3. Estabilidad frente a oxidantes

En matraces aforados de 25 ml se pone sufi --

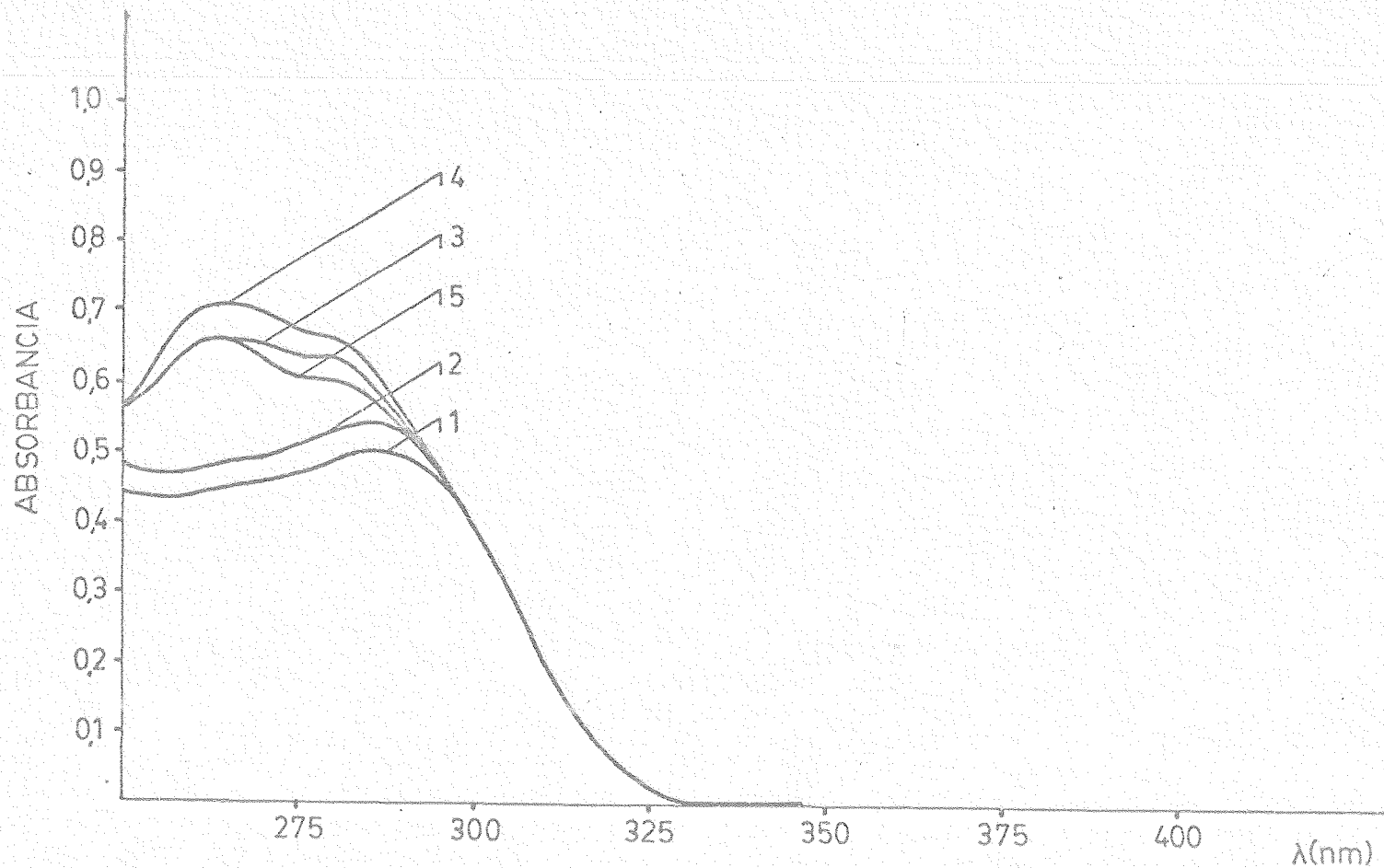


Fig.18.- Estabilidad en medio alcalino: 1.- a los 5 min.; 2.- a las 3 hr.;
3.- a las 20 hr.; 4.- a los 2 días; 5.- a los 5 días

TABLA IXESTABILIDAD TERMICA

TEMPERATURA	TIEMPO (min.)	PESO (g.)
110°C	0	0,2265
	15	0,2225
	30	0,2224
	60	0,2226
	180	0,2223
150°C	0	0,2625
	15	0,2575
	30	0,2576
	60	0,2574
	180	0,2576
200°C	0	0,2598
	5	0,2551
	10	0,2353
	15	0,2346
	30	0,2338

ciente disolución de TTB de manera que, al diluir, su concentración sea $4,0 \cdot 10^{-5}$ M, condicionamos el pH con disolución reguladora acético-acetato de pH 5,0 y añadimos un exceso de peroxidisulfato potásico (0,1 g). Medimos periódicamente la absorbancia entre 325 y 450 nm, frente a un blanco igual pero sin TTB. En la Figura 19 representamos los espectros registrados periódicamente, de donde deducimos que se produce un descenso paulatino en la absorbancia de alrededor de un 15% cada 15-20 minutos, acompañado de un leve desplazamiento hipsochrómico hacia 400 nm.

De la misma forma, en matraces aforados de 10 ml se añade suficiente TTB de manera que, al enrasar, la concentración sea $2,0 \cdot 10^{-5}$ M; se le agregan 2 ml de H_2O_2 al 1%, y enrasamos con HCl 0,1 N o con solución reguladora acético-acetato. En la Figura 20 aparecen trazados los espectros de absorción periódicamente frente a un blanco apropiado. Deducimos que:

- a) En medio ácido fuerte (pH 1,1), el descenso de la absorbancia es gradual (a las 3 horas, la absorbancia ha descendido un 65%) y se acompaña de un leve desplazamiento hipsochrómico.
- b) En medio débilmente ácido (pH 5,1) se observa un descenso rápido de la absorbancia, desapareciendo prácticamente el máximo a los 30 minutos, a la vez que se produce un ligero desplazamiento hipsochrómico.

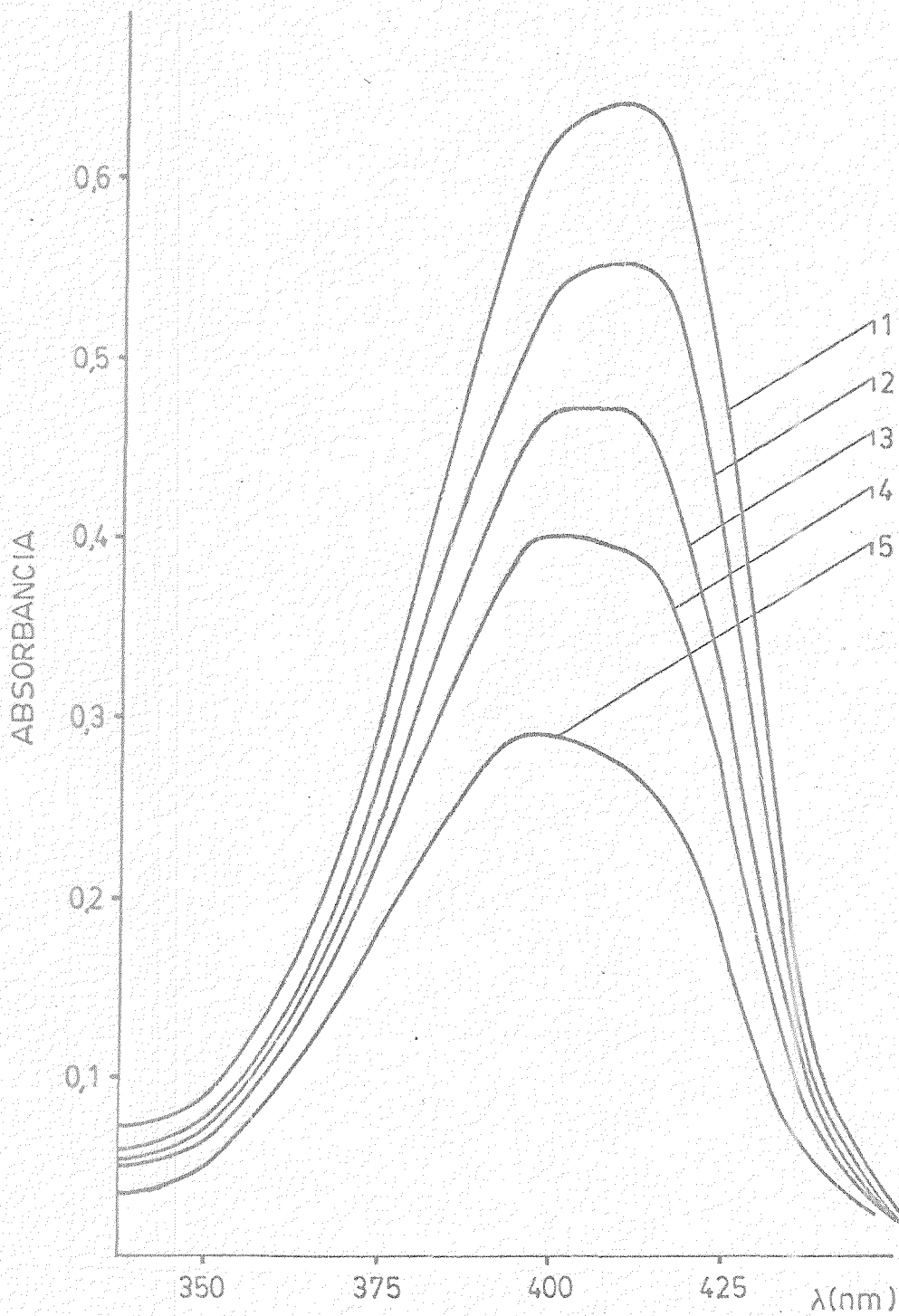


Fig.19.- Estabilidad frente a oxidantes ($K_2S_2O_8$):
 1.- a los 5 min.; 2.- a los 30 min.; 3.-
 a los 50 min.; 4.- a los 70 min.; 5.- a los 105 min.

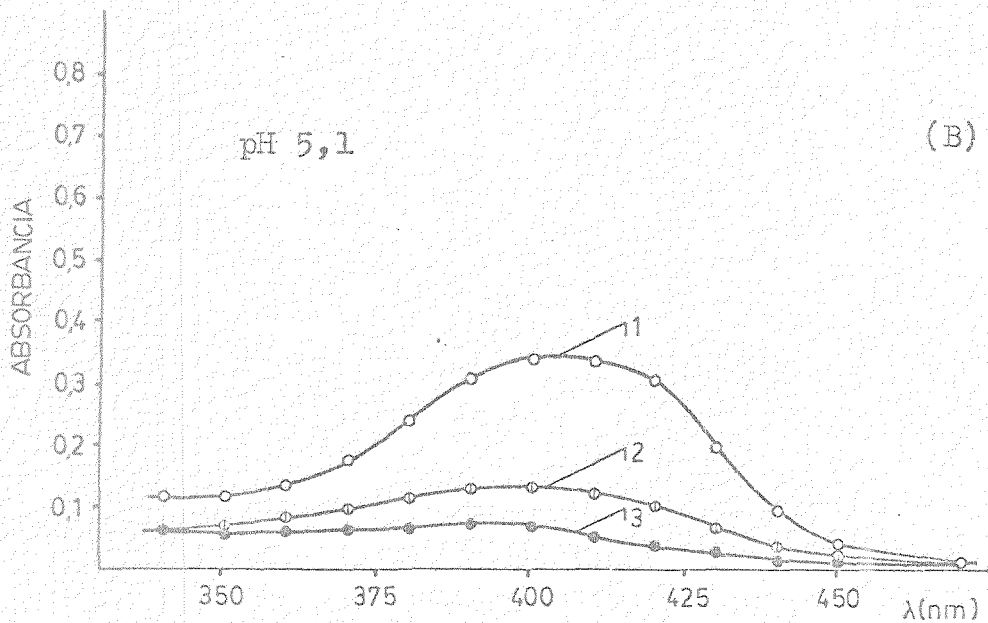
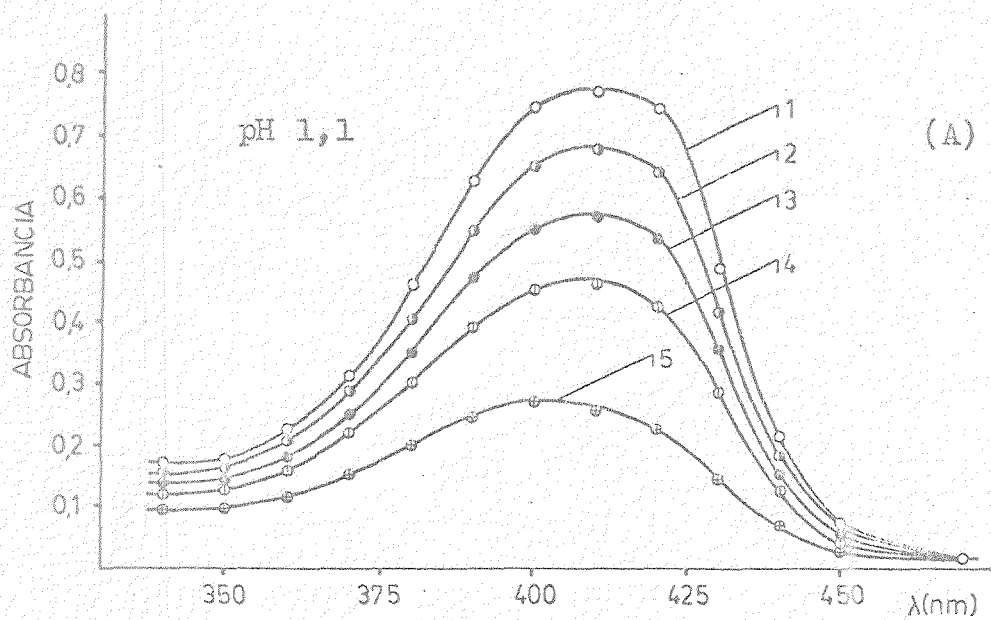


Fig.20.- Estabilidad frente a oxidantes (H_2O_2)
 A: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 30 min.; 3.- a los 60 min.; 4.- a los 90 min.; 5.- a las 3 hr.
 B: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 15 min.; 3.- a los 30 min.

I.6.4. Estabilidad frente a reductores

En matraces aforados de 25 ml se pone suficiente cantidad de TTB para que, al diluir, su concentración sea $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, añadimos un exceso de ácido ascórbico (0,1 g) y enrasamos con disolución reguladora acético-acetato de pH 5,0. Medimos periódicamente los espectros de absorción entre 325 y 450 nm frente a un blanco sin TTB, y los representamos en la Figura 21, donde se observa un descenso del máximo de 412 nm del 10% a los 60 minutos, y del 95% a las 24 horas.

Así mismo, en matraces aforados de 10 ml se pone cantidad suficiente de TTB para, al enrasar, conseguir una concentración de $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, se añaden 2 ml de solución de ácido ascórbico al 1% y se enrasa con HCl 0,1 N y con solución reguladora acético-acetato. En la Figura 22 se recogen los espectros de absorción trazados periódicamente. Se observa que:

- a) En medio ácido fuerte (pH 1,1) se produce un descenso en la absorbancia a 412 nm de un 15% en la primera hora, y de un 60% al cabo de las 6 horas.
- b) En medio débilmente ácido (pH 5,1) se produce un descenso uniforme en la absorbancia a 412 nm de un 30% cada 30 minutos.

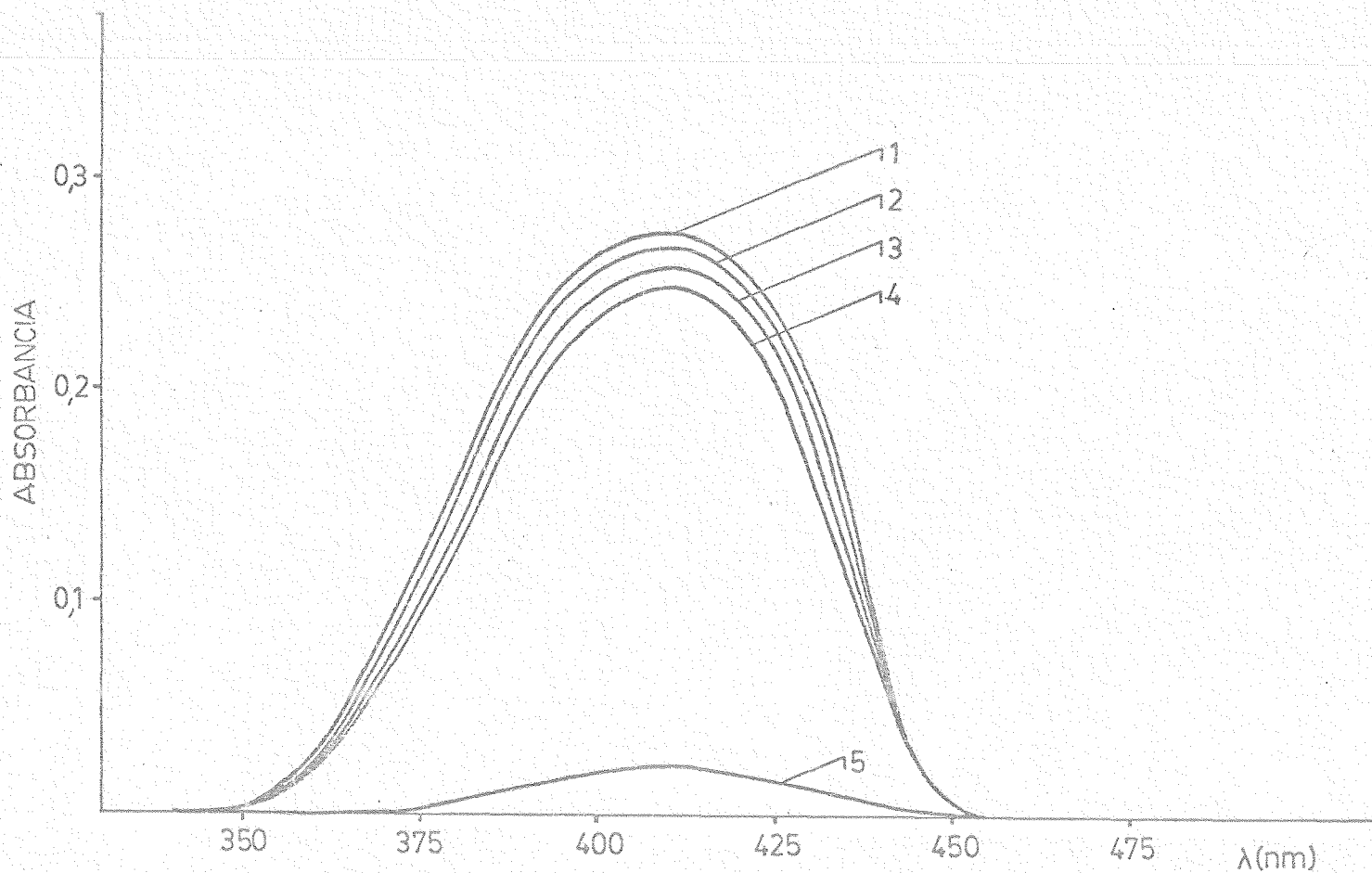


Fig.21..- Estabilidad frente a reductores: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 20 min.; 3.- a los 40 min.; 4.- a los 60 min.; 5.- a las 24 hr.

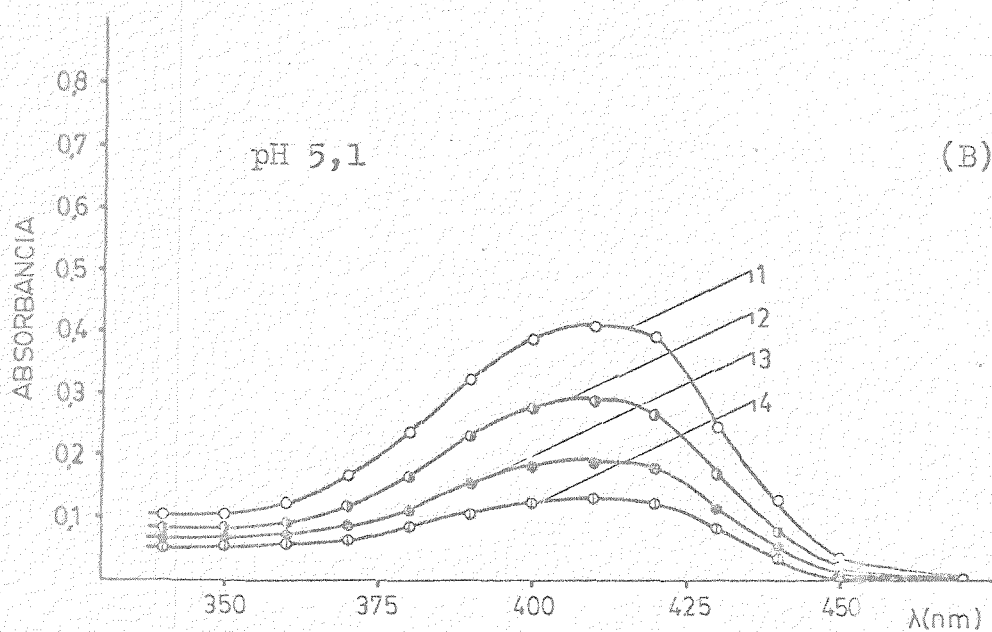
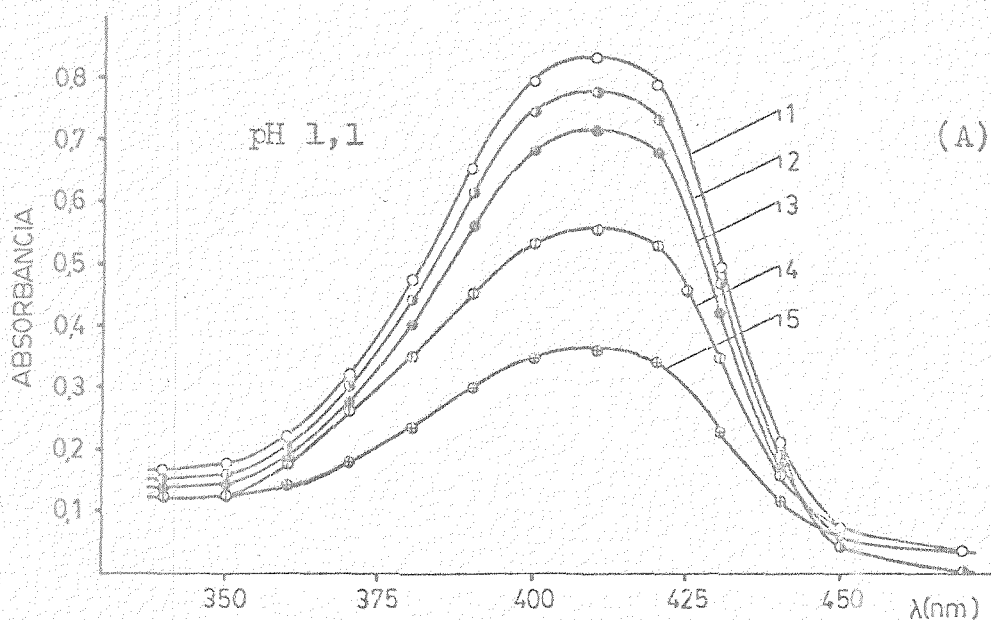


Fig.22.- Estabilidad frente a reductores

A: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 30 min.; 3.- a los 60 min.; 4.- a las 3 hr.; 5.- a las 6 hr.

B: 1.- a los 5 min.; 2.- a los 30 min.; 3.- a los 60 min.; 4.- a los 90 min.

CAPITULO II

ENSAYOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DEL TTB

En este capítulo se proponen los diversos ensayos para la identificación del TTB. Los ensayos propuestos son los clásicos que se citan en la bibliografía para los barbitúricos.

II.1. ENSAYO DE ZWIKKER

El ensayo de Zwikker (15) se basa en la formación de un complejo de ligando mixto entre un barbitúrico, un ión metálico de transición divalente y una base orgánica, generalmente piridínica. Se forma un precipitado coloreado, que presenta interesantes propiedades cristalográficas.

REACTIVO: Está constituido por una mezcla de 0,5 ml de piridina, 4 ml de solución acuosa de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 10% y 5 ml de agua destilada.

PREPARACION DEL PROBLEMA: Se preparan disoluciones de TTB en dimetilformamida al 2,5%, 2% y al 0,75% p/v.

TECNICA: Se mezclan 0,2 ml de la disolución de TTB al 2,5% con 2 ml de piridina al 10% y se añade a continuación 2 ml de reactivo. Aparece un precipitado de color rojo oscuro

que se observa mejor al centrifugar. Este ensayo testigo se comparó con un ensayo en blanco, que tenía los mismos reactivos pero sin TTb, y que era una disolución azul.

II.1.1. Cálculo de la sensibilidad del ensayo

Procedimos a realizar un estudio semicuantitativo de la sensibilidad del ensayo que nos estableciera el límite de perceptibilidad y el pD. Para ello, realizamos una serie de ensayos paralelos según la técnica descrita más arriba, pero utilizando cantidades decrecientes de TTb. De esta forma, determinamos la cantidad mínima de precipitado perceptible visualmente, después de centrifugar; la cantidad correspondiente de TTb constituye el límite de perceptibilidad, que resultó ser de 1,25 mg.

El límite de perceptibilidad se refiere a la cantidad, pero no a la concentración. Por ello, se recurre al concepto de concentración límite o límite de dilución, D:

$$D = \frac{\text{límite de perceptibilidad } (\gamma) \cdot 10^{-6}}{\text{volumen del ensayo (ml)}} =$$

$$= \frac{1,25 \cdot 10^3 \gamma \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \gamma^{-1}}{4,2 \text{ ml}} = 3,0 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$pD = -\log D = -\log 3,0 \cdot 10^{-4} = 3,5$$

De acuerdo con este valor del pD , concluimos -- que la reacción es poco sensible, aunque no está muy lejos -- del valor de sensibilidad normal, $pD = 4$.

o o o

Se llevaron a cabo ensayos cualitativos de extracción en la reacción de Zwikker. Se ensayaron disolventes orgánicos de distinta polaridad y constante dieléctrica, con y sin agente salino, y variando el tiempo de extracción. De -- este estudio podemos deducir que la extracción del precipitado rojo es problemática, puesto que permanece en la interfase o bien se extrae solo parcialmente. Únicamente en cloroformo y utilizando perclorato sódico como agente salino, se conse--guía una extracción momentánea, pero al reposar y separarse -- completamente las dos fases, el complejo rojo tendía a acumu--larse en la interfase.

II.2. ENSAYO DE PARRI

La reacción de Parri es general para los barbitúricos y tiobarbitúricos, aunque no es específica, pues la -- producen también algunas sulfamidas e hipnóticos de la serie pirimidínica y piperidínica.

La técnica primitiva de Parri (16) se basaba en la reacción del barbitúrico con cloruro cobaltoso y amo--níaco en medio metanólico; se han efectuado diversas modifi--caciones en cuanto al componente básico. La piperidina (17)

es particularmente insensible frente a concentraciones no estequiométricas de los compuestos reaccionantes.

En todos los casos se forma un complejo de color violeta de fórmula general $(Barbt)_2Co(amina)_2$ (18).

TECNICA: En un tubo de ensayo se ponen 50 mg de TTB, se añaden 2 ml de una solución metanólica al 1% de nitrato de cobalto $(NO_3)_2Co \cdot 6H_2O$, añadiendo a continuación 0,5 ml de una solución metanólica al 10% de piperiridina. A continuación, se centrifuga durante 3 minutos, separándose un sedimento pardo y un sobrenadante de color violeta.

Paralelamente, se lleva a cabo una prueba en blanco, sin TTB, obteniéndose un sedimento pardo y un sobrenadante incoloro.

II.2.1. Cálculo de la sensibilidad del ensayo

Para determinar el límite de perceptibilidad y la concentración límite del ensayo, realizamos una serie de pruebas siguiendo la técnica anteriormente descrita, pero disminuyendo progresivamente la cantidad de TTB. De esta forma, determinamos la cantidad mínima de TTB que da lugar a la aparición, después de centrifugar, de un sobrenadante de color --

violeta. Esta cantidad (límite de perceptibilidad) resulta ser de 20 mg.

A partir de este valor y del volumen del ensayo (2,5 ml) podemos deducir la concentración límite, D:

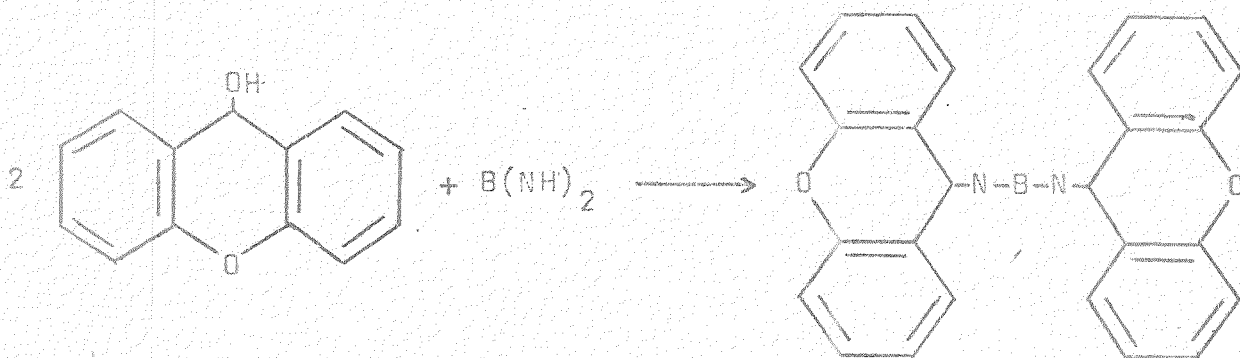
$$D = \frac{20 \cdot 10^3 \gamma \cdot 10^{-6} \text{ g} \cdot \gamma^{-1}}{2,5 \text{ ml}} = 8,0 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$pD = -\log D = -\log 8,0 \cdot 10^{-3} = 2,1$$

De este valor del pD se puede deducir que la reacción de Parri para el TTB es poco sensible.

II.3. CONDENSACION CON XANTIDROL

Los barbitúricos y tiobarbitúricos condensan rápidamente en solución acética con xantidrol, dando los compuestos dixantilados, fácilmente caracterizables por sus puntos de fusión (19):



TECNICA: 50 mg de TTB se disuelven en la mínima cantidad posible de DMF (2 ml), se añaden 0,5 ml de ácido acético glacial y se agregan 2,5 ml de una solución metanólica de xantidrol al 4%. Se calienta en baño de agua durante un minuto y se deja en friar. Se observa la precipitación abundante de unos cristales anaranjados a los que, después de separados por filtración y secos, se determina el punto de fusión, utilizando un microscopio con platina de Kofler.

El punto de fusión del derivado dixantílico - del TTB, determinado varias veces, es de $251 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los cristales presentan al microscopio un color amarillo-anaranjado, y una forma rectangular alargada.

CAPITULO III

DETERMINACION VOLUMETRICA

Y FOTOMETRICA DEL TTB

En este capítulo abordamos los ensayos de determinación cuantitativa del TTB.

Hacemos un estudio y puesta a punto de la volumetría en medio acuoso y en medio no acuoso, y el estudio de las características fotométricas del TTB, que nos conducirá a la proposición de un método para su determinación espectrofotométrica.

III.1. VOLUMETRIA ACIDO-BASE EN MEDIO ACUOSO

Dentro de los diversos métodos analíticos que se han empleado para la determinación de barbitúricos y tio-barbitúricos, la valoración volumétrica en medio acuoso es un método práctico, sencillo y de una precisión aceptable (20).

Para llevar a cabo la neutralimetría procedimos en primer lugar a la preparación y estandarización del reactivo valorante, hidróxido sódico.

III.1.1. Preparación de NaOH 0,01 N

En un vaso de precipitados de 50 ml se pesan 0,6 g de NaOH en lentejas (se pesa una cantidad en exceso sobre la requerida, porque hay que lavar para eliminar la costra superficial de carbonato). Se lavan, se desprecian los lavados y, finalmente, se disuelven en agua destilada y despro-

vista de CO_2 (calentar a ebullición el agua destilada), se --
 trasvasa a un matraz aforado de un litro de capacidad y se --
 diluye con agua destilada hasta la señal de enrase. Guardar
 en frasco de color topacio y provisto de un tubo con cal so-
 dada.

III.1.2. Estandarización de NaOH 0,01 N

Se prepara una disolución de ftalato ácido de potasio, por pesada, exactamente 0,0100 N, 10 ml de la cual se llevan a un vaso de precipitados que sirve como vaso de valo-
 ración, y en el que, después de añadir 2 gotas de disolución --
 de fenolftaleína al 0,1%, se introducen un agitador magnético
 y un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl. Desde una bureta
 vamos añadiendo poco a poco volúmenes crecientes de la sosa
 a estandarizar, registramos simultáneamente el pH y el volu-
 men de NaOH añadido, y luego representamos estos datos (Figu-
 ras 23 y 24).

A partir de los datos experimentales obteni-
 dos, calculamos los valores del factor para las dos disolucio-
 nes de hidróxido sódico 0,01 N, que posteriormente vamos a em-
 plear como reactivos valorantes:

NaOH 0,01 N, $f = 0,8850$ (Disolución 1)

NaOH 0,01 N, $f = 1,2820$ (Disolución 2)

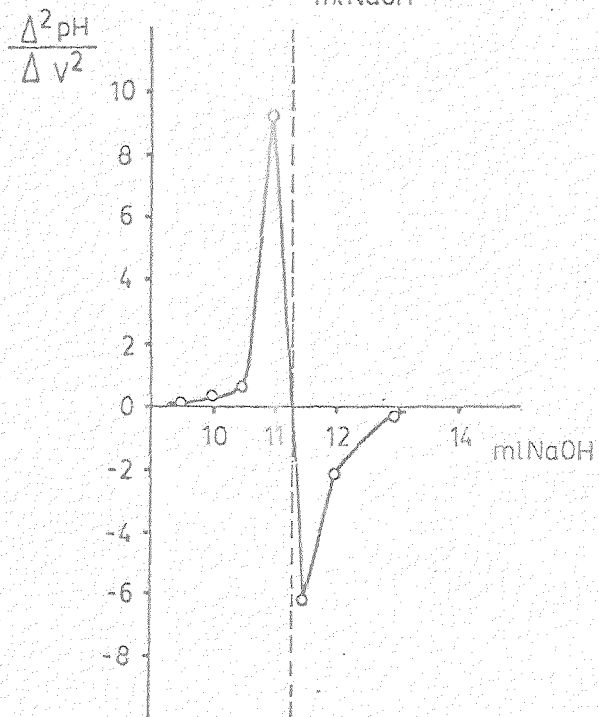
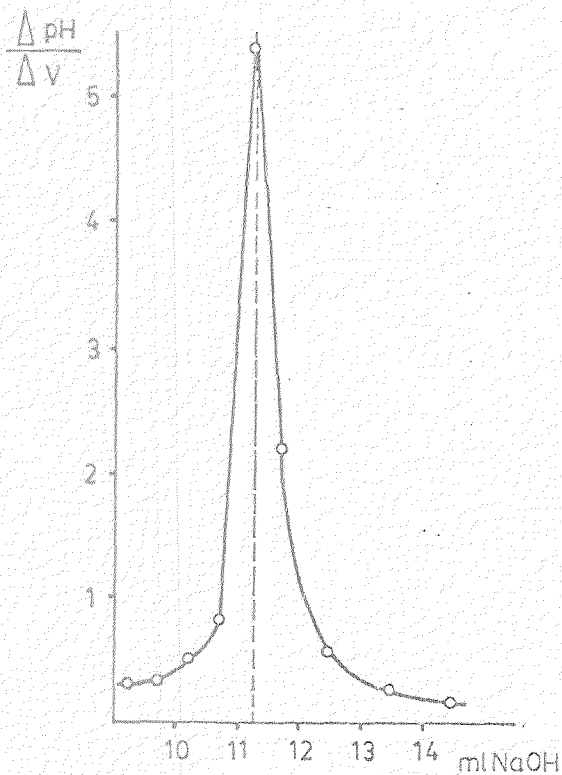
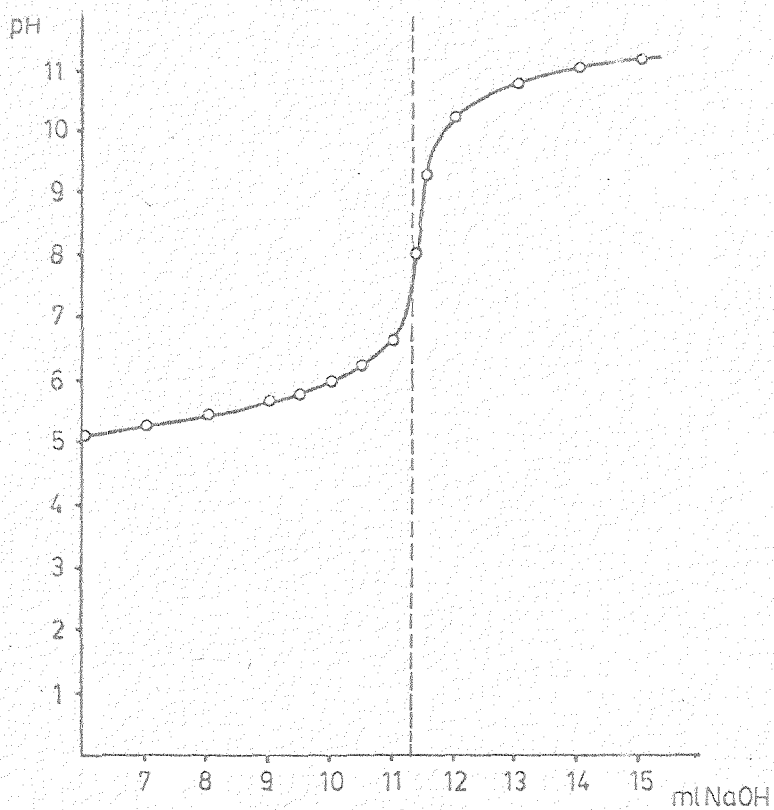


Fig.23.- Estandarización de NaOH 0,01 N (f = 0,8850)

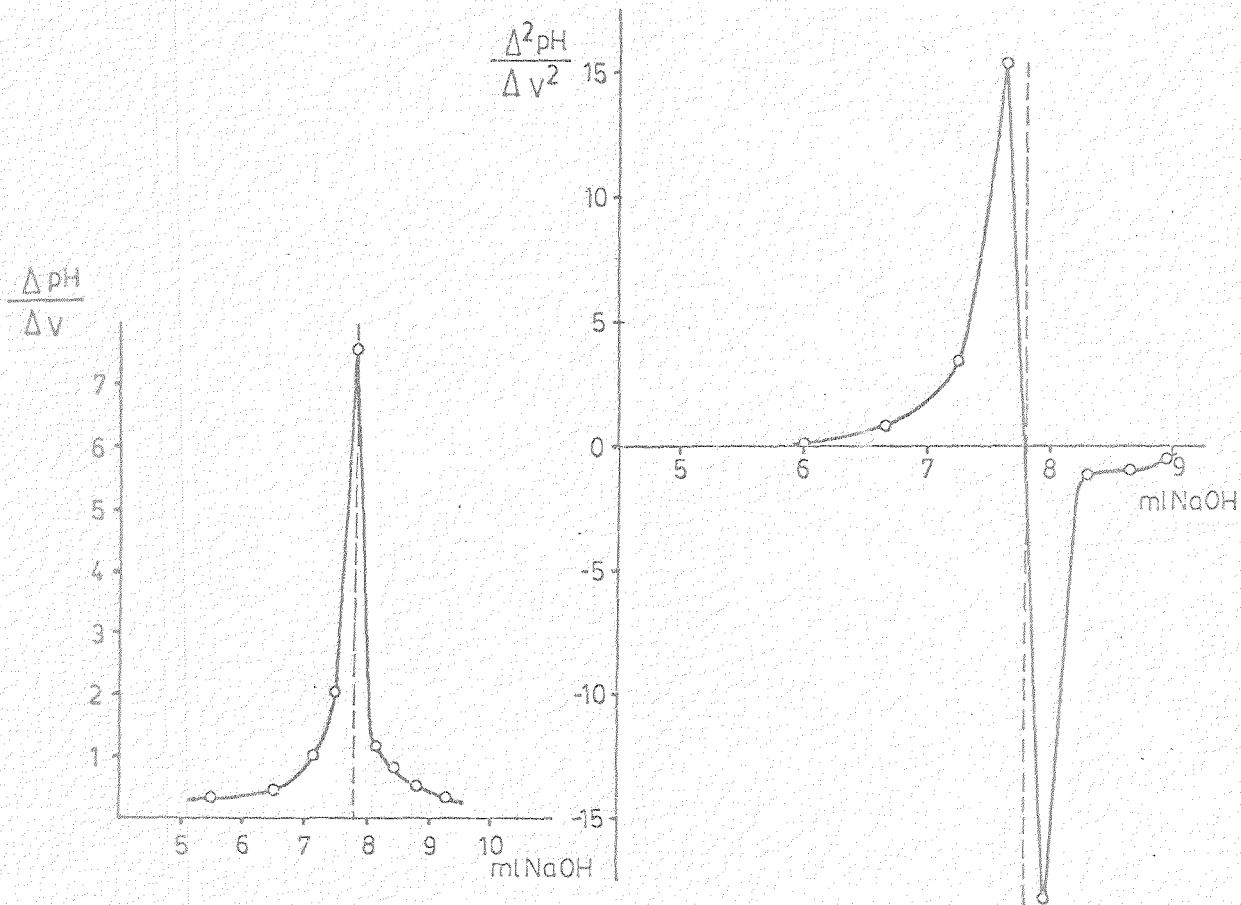
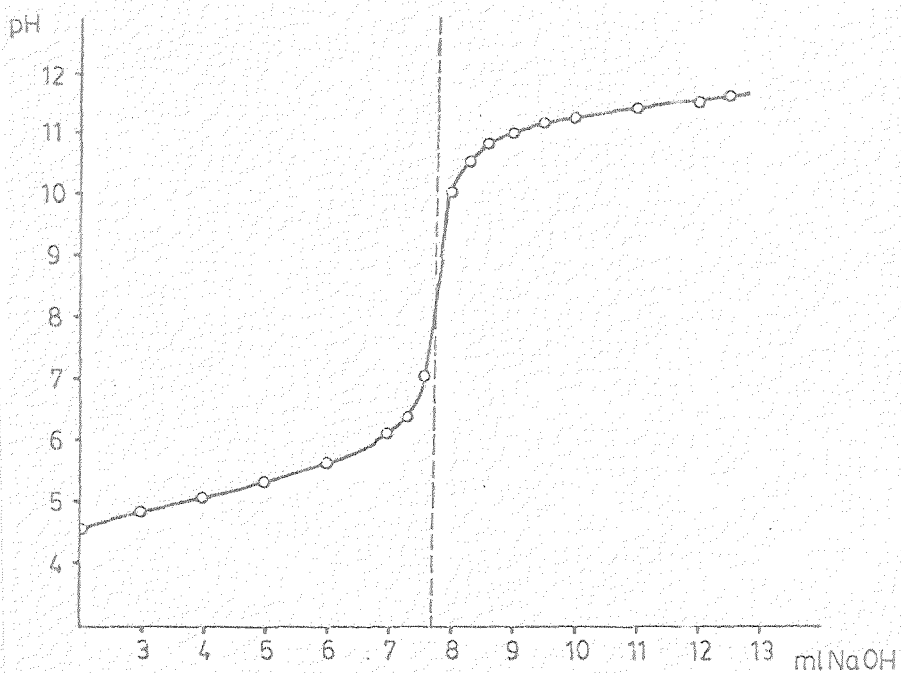


Fig.24.- Estandarización de NaOH 0,01 N (f = 1,2820)

III.1.3. Valoración de TTB

En un vaso de precipitados de 100 ml se ponen, exactamente pesados, 23,8 mg de TTB, que equivalen a 0,1 mmol, y se disuelven en 40 ml de una mezcla de DMF-agua al 75% en DMF. Se añaden 2 o 3 gotas de disolución de fenolftaleína al 0,1% y se valora desde una microbureta con las disoluciones de NaOH 0,01 N previamente estandarizadas. Se registran simultáneamente, a lo largo de la valoración, el pH y el volumen en ml de NaOH añadido, para lo cual sumergimos en el vaso de valoración, además del agitador magnético, un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl.

En las Figuras 25 a 29 se ofrecen los resultados experimentales, incluyendo la determinación del punto final por los métodos de la primera y la segunda derivadas. De los mismos, se infieren los cálculos de la cantidad media de TTB encontrado, la desviación estándar, el porcentaje de error y el porcentaje de recuperación (Tabla X).

III.2. VOLUMETRIA ACIDO-BASE EN MEDIO NO ACUOSO

III.2.1. Estandarización de hidróxido de tetrabutilamonio

Se pesan exactamente en una balanza analítica entre 0,2000 y 0,2500 g de ácido benzoico ($P_{eq} = 122,1$), en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 25 ml de DMF y dos gotas de solución metanólica de azul timol al 0,3%. Se valora desde una microbureta con hidróxido de tetrabutilamonio -

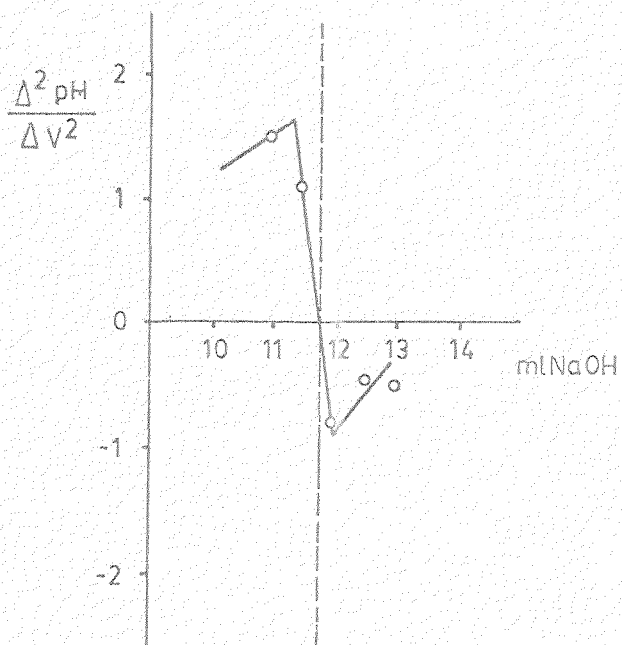
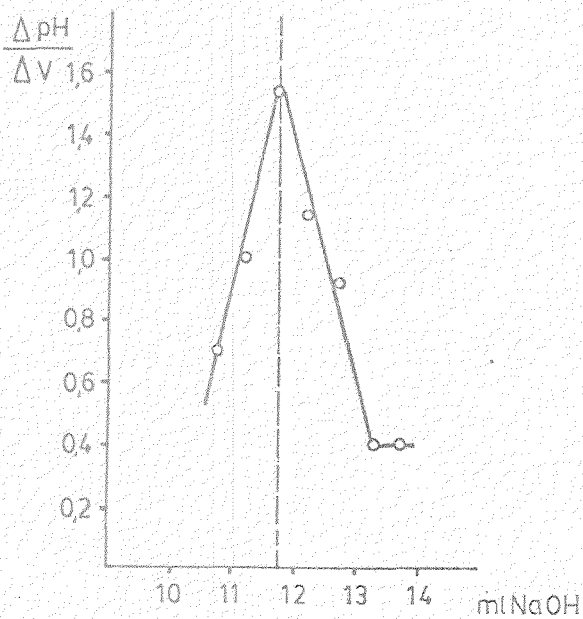
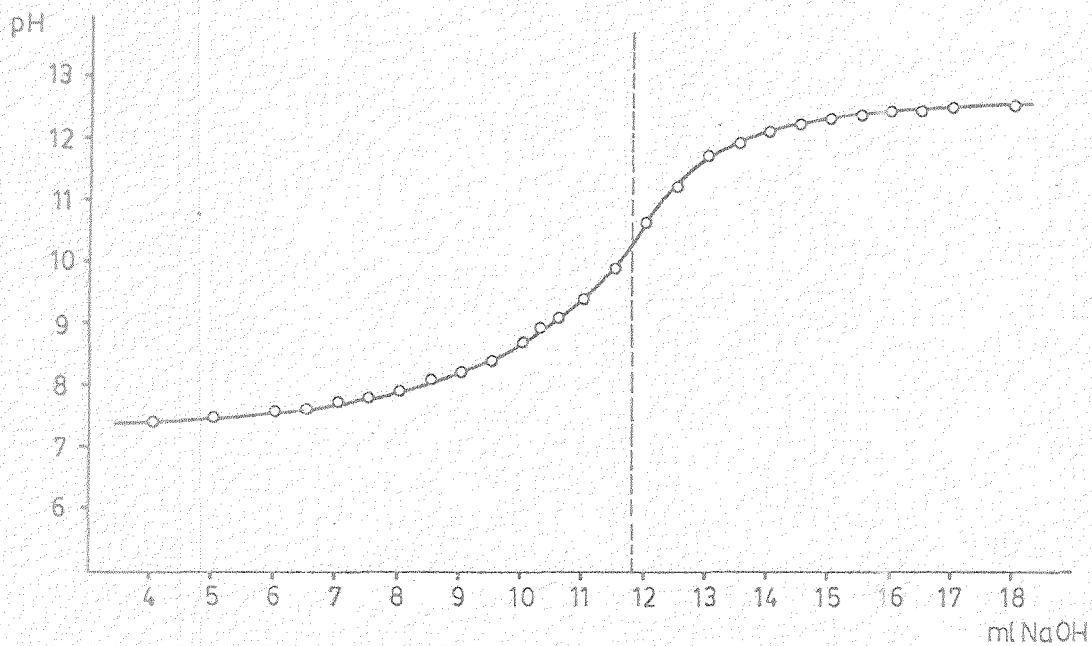


Fig.25.- Valoración de TTB con NaOH 0,01 N ($f = 0,8850$):
primera valoración

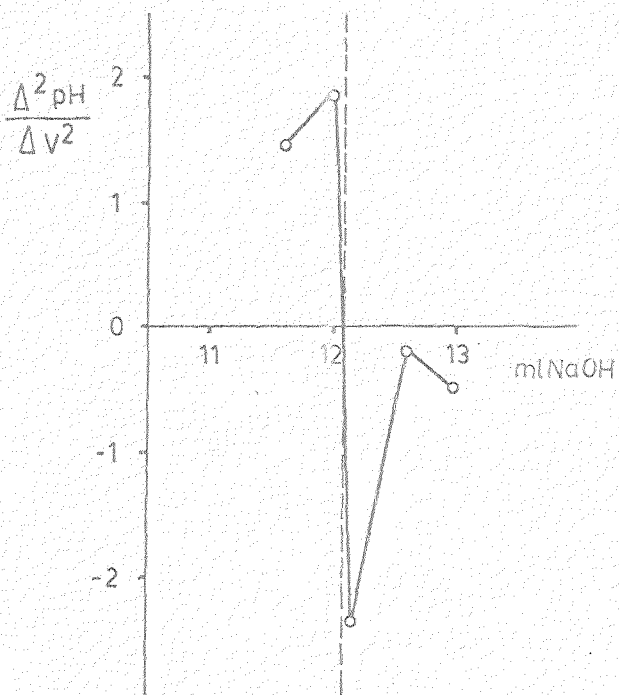
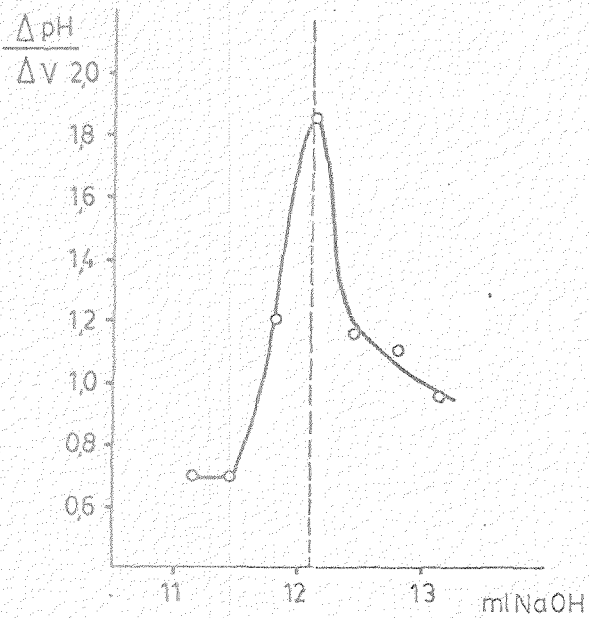
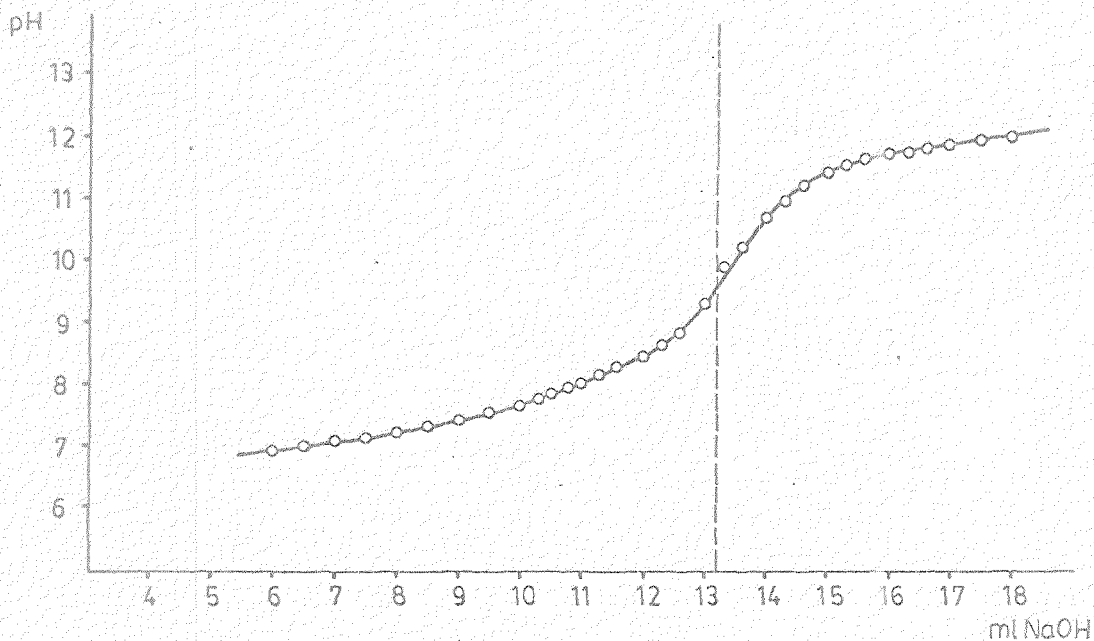


Fig.26.- Valoración de TTB con NaOH 0,01 N ($f = 0,8850$):
segunda valoración

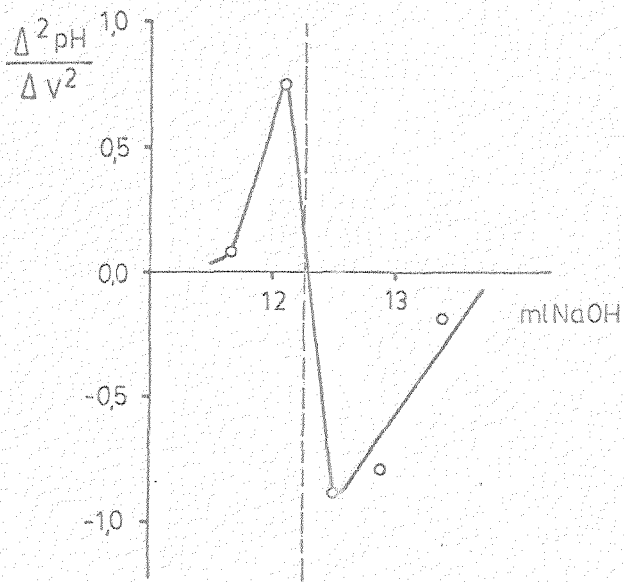
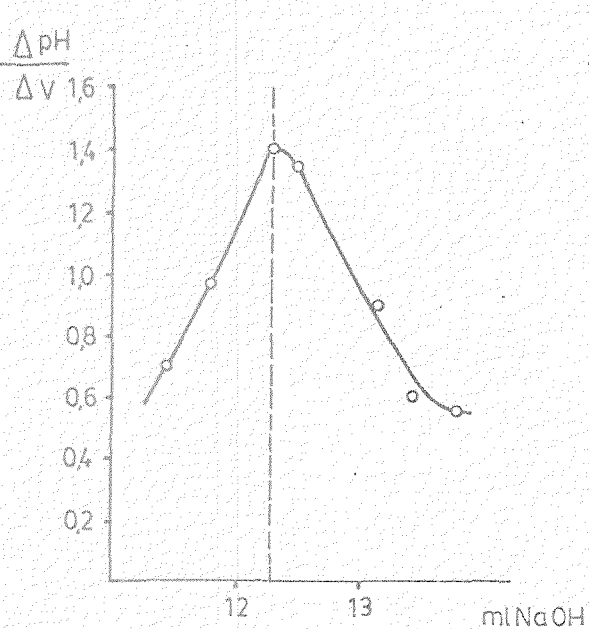
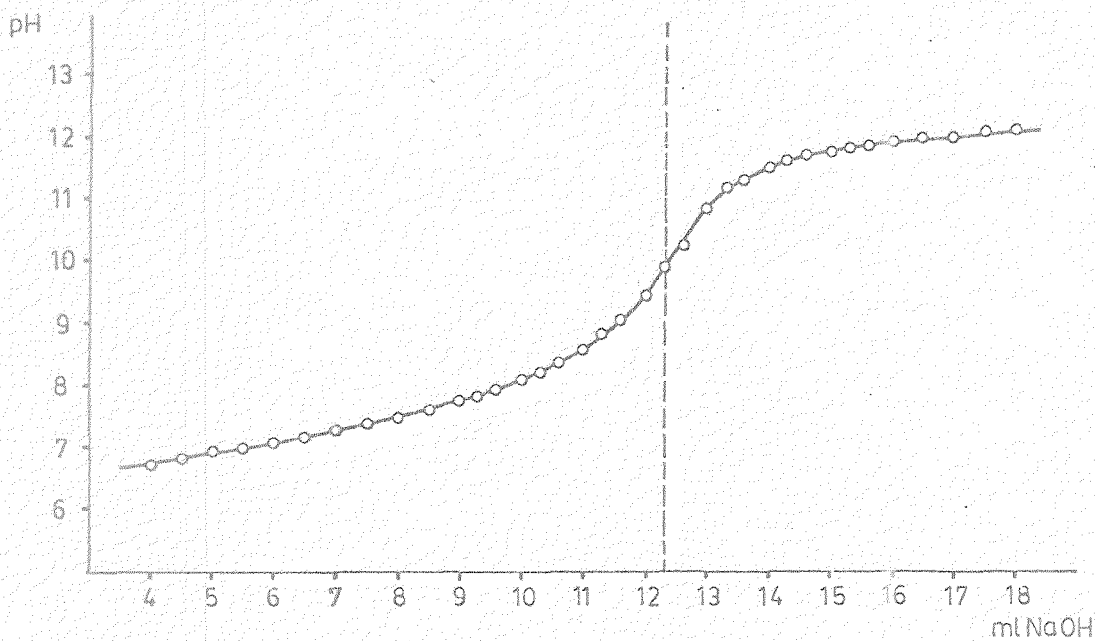


Fig.27.- Valoración de TTB con NaOH 0,01 N ($f = 0,8850$):
tercera valoración

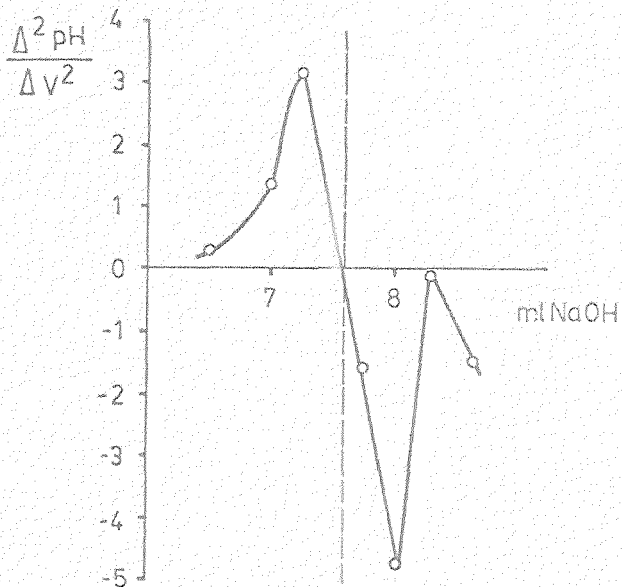
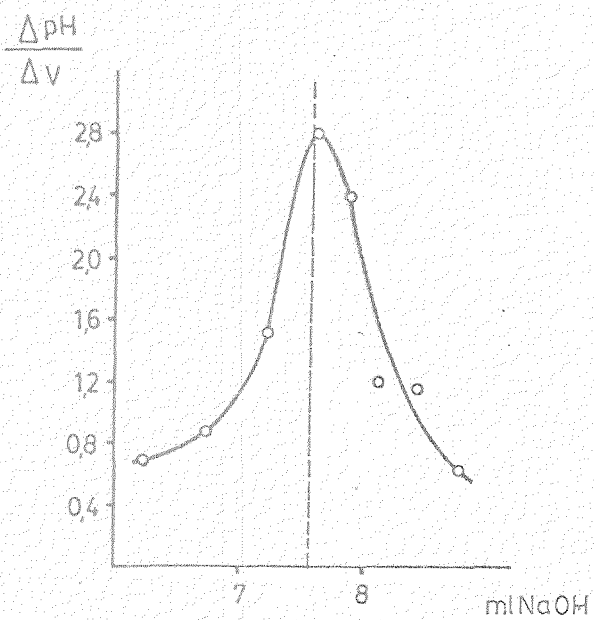
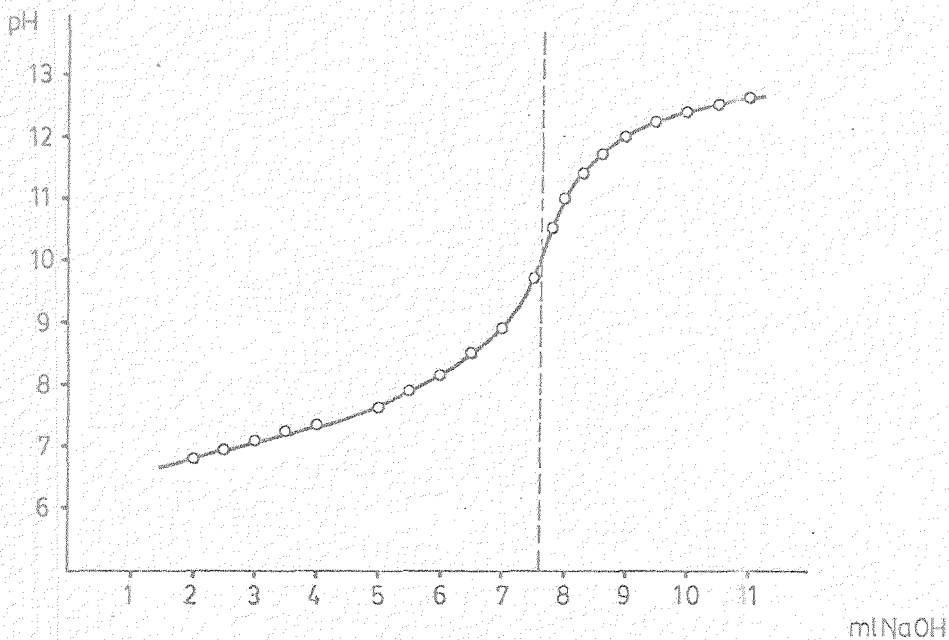


Fig.28.- Valoración de TTB con NaOH 0,01 N ($f = 1,2820$):
cuarta valoración

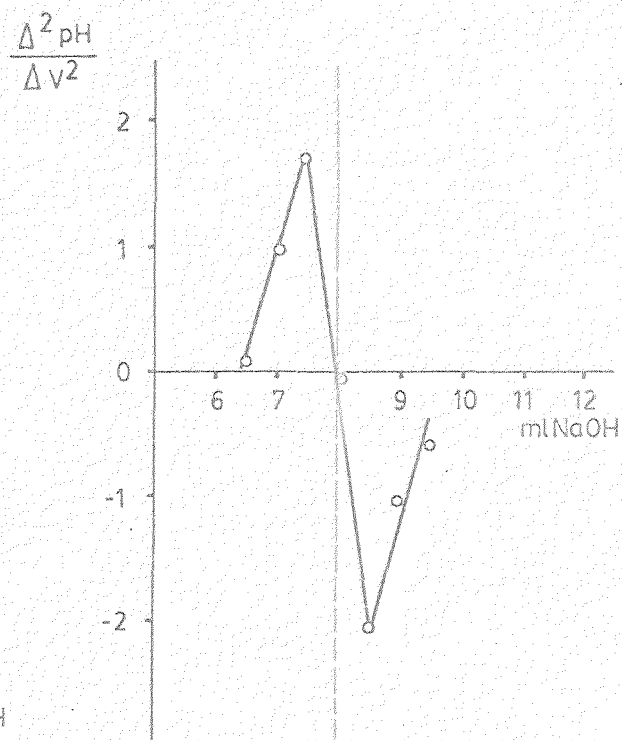
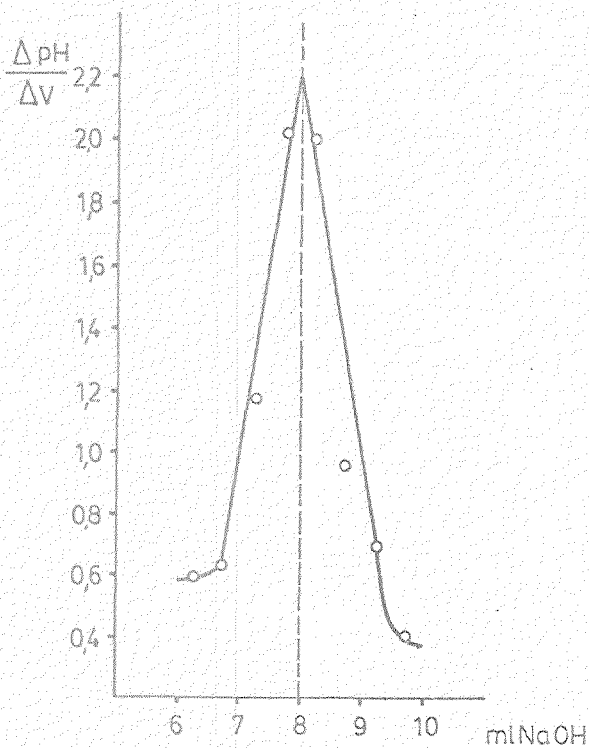
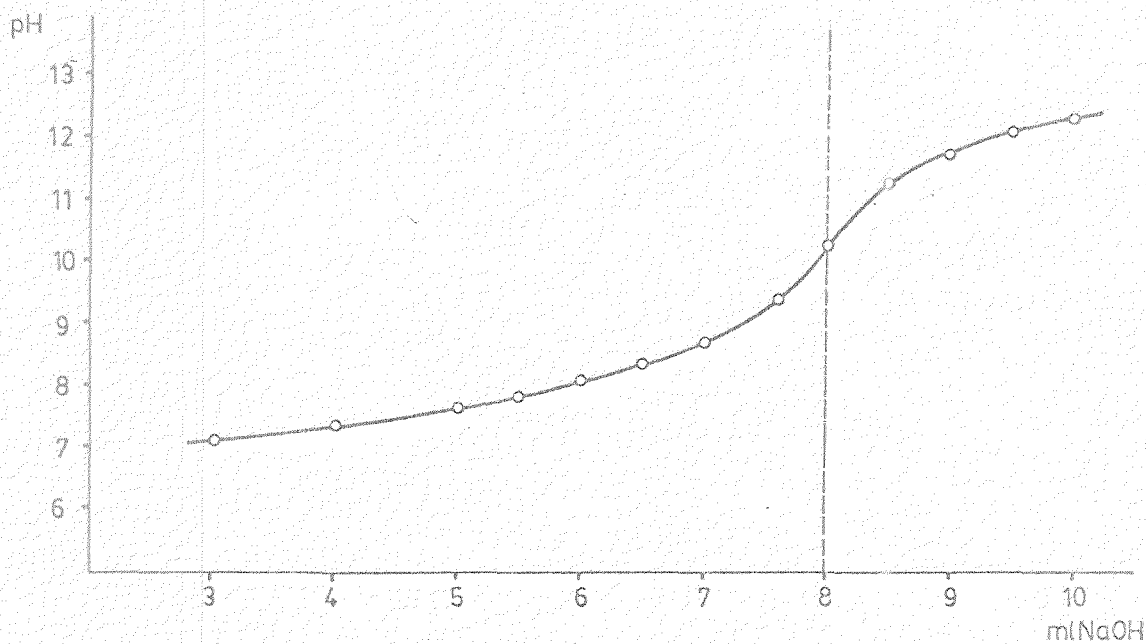


Fig. 29.- Valoración de TTB con NaOH 0,01 N ($f = 1,2820$): quinta valoración

TABLA XVALORACION EN MEDIO ACUOSO

NORMALIDAD DEL NaOH	ml GASTADOS DE NaOH	mg HALLADOS DE TT8
0,01 (f= 0,8850)	11,8	24,8
	12,2	25,7
	12,3	25,9
0,01 (f= 1,2820)	7,6	23,2
	8,0	24,4

VALOR PROMEDIO: 24,8 mg

DESVIACION ESTANDAR: 1,088

% ERROR: 5,4

% RECUPERACION: 104,2

(HTBA) en solución metanólica, reactivo valorante, hasta viraje del indicador al azul. Paralelamente, se lleva a cabo una valoración en blanco, sin la presencia de ácido benzoico.

Se realizaron varias determinaciones, y se obtuvieron los siguientes resultados:

- Peso medio de ácido benzoico: 0,2182 g
- Volumen medio gastado de HTBA: 18,7 ml
- Corrección del indicador: 0,1 ml
- Volumen medio corregido gastado de HTBA: 18,6 ml
- Normalidad media del HTBA: 0,1 ($f = 0,9624$)

III.2.2. Valoración del TTB en DMF

En un vaso de precipitados de 100 ml se ponen exactamente pesados, 238,0 mg de TTB (1 mmol) y se disuelven en 25 ml de DMF. Se añaden 2 gotas de solución metanólica de azul timol al 0,3% y se valora desde una microbureta con la disolución de HTBA que previamente hemos estandarizado, hasta viraje del indicador del naranja al verde-azulado (21).

Así mismo, se realiza una valoración en blanco sin TTB, en la que se consumen 0,10 ml de HTBA.

En la Tabla XI se muestran los resultados experimentales, incluyendo los datos de la desviación estándar, el porcentaje de error de la media y el porcentaje de recuperación.

TABLA XIVALORACION EN MEDIO ANHIORO

ml EFECTIVOS DE HTBA	mg HALLADOS DE TTB
10,20	233,63
10,00	229,05
10,00	229,05
10,25	234,78
10,35	237,07
10,20	233,63
10,00	229,05
10,30	235,92
9,80	224,47
10,25	234,78
9,85	225,61

VALOR PROMEDIO: 231,55

DESVIACION ESTANDAR: 4,2807

% ERROR: 1,2

% RECUPERACION: 97,3

III.3. DETERMINACION FOTOMETRICA

Ya hemos visto en el capítulo I las características fotométricas de las disoluciones acuosas de TT8:

a) En medio ácido fuerte y débil, la disolución tiene color amarillo, y presenta un máximo de absorción a 412 nm.

b) En medio neutro, la disolución se vuelve incolora, y aparece un máximo de absorción a 265 nm.

c) En medio alcalino, la disolución es también incolora, y presenta un máximo de absorción a 285 nm.

Para la determinación fotométrica del TT8 elegimos el máximo de absorción a 412 nm, por varias razones: -- en primer lugar por encontrarse en la zona del visible, con la indudable comodidad que ello supone; y en segundo lugar -- por ser el máximo de absorción que presenta mayor absortividad.

III.3.1. Influencia del pH

Uno de los puntos más importantes en el establecimiento de un método fotométrico es la determinación del pH óptimo del medio, mediante el estudio de la influencia del mismo en la absorbancia de la especie coloreada. Para ello, -- se preparan una serie de muestras de TT8 de concentración -- $2,0 \cdot 10^{-5}$ M, en un medio de acetona al 5%, a distintos pH, que se consiguen con HCl ó NaOH, y representamos los valores de absorbancia a 412 nm, medidos a los 5 minutos, frente al pH (Figura 30), utilizando un blanco sin TT8.

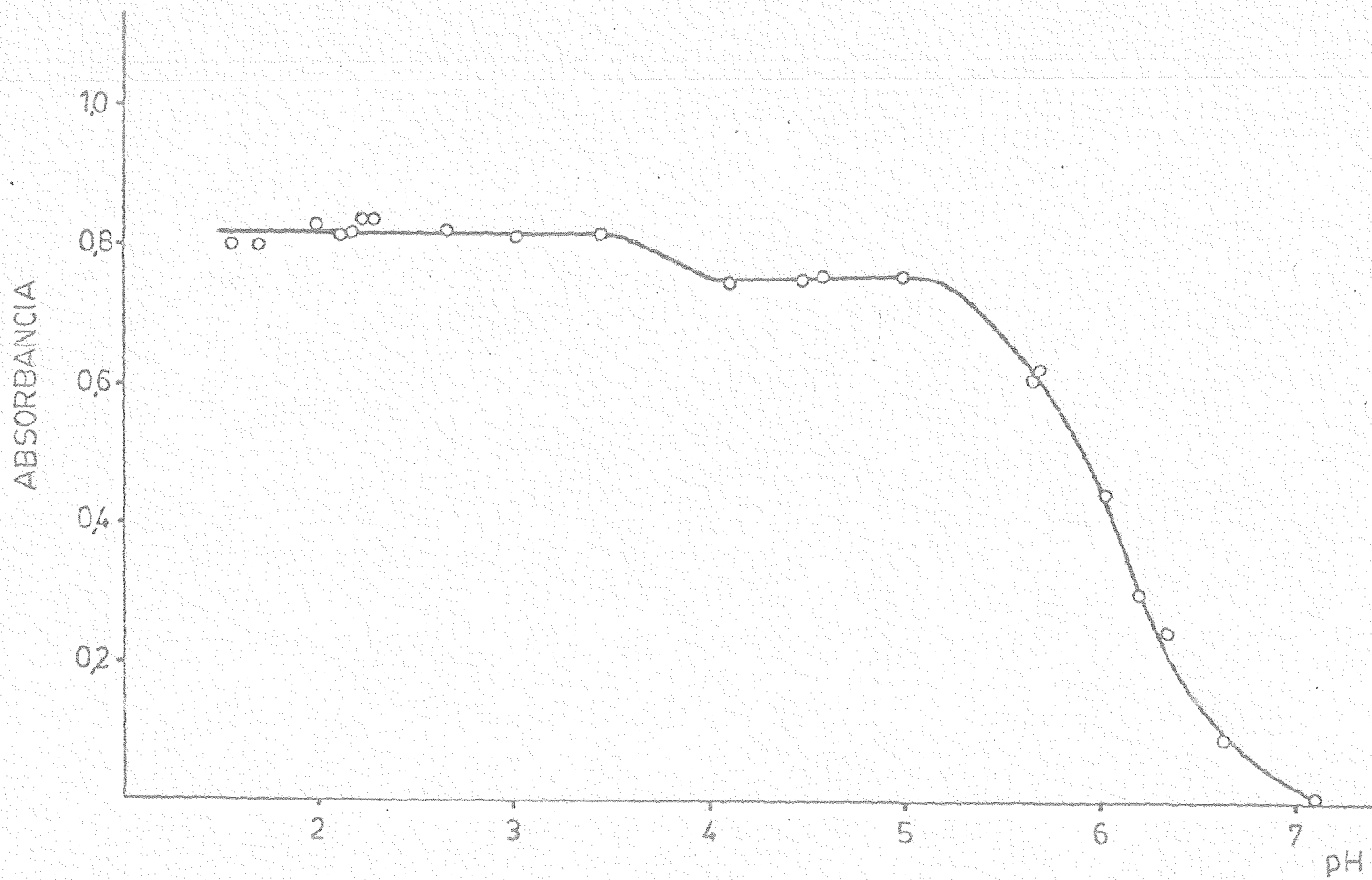


Fig.30.- Influencia del pH

La absorbancia es máxima en medio ácido, y se mantiene prácticamente constante para pH inferiores a 3,5, disminuyendo rápidamente a pH mayores de 5.

Queda, pues, una zona de trabajo bastante amplia y fácil de conseguir con HCl.

III.3.2. Estabilidad con el tiempo

En matraces de 10 ml se preparan disoluciones de TT8 de concentración $1,0 \cdot 10^{-5}$ M en un medio de acetona al 5% y a un pH próximo a 2, que se consigue poniendo 1 ml de HCl 0,1 M. Se mide periódicamente la absorbancia a 412 nm frente a un blanco sin TT8. Los resultados se expresan en la Tabla XII, donde se puede apreciar que hay un margen de 20 minutos, a partir de los 10 minutos de preparadas, en que las muestras son estables. Así pues, en lo que sigue, las medidas fotométricas se efectuarán a los 15 minutos de preparadas las muestras.

III.3.3. Influencia de la fuerza iónica

Para concluir el estudio de las condiciones óptimas de operación, se determina la influencia que pudiera tener la fuerza iónica de las disoluciones en la absorbancia del TT8.

Se preparan, en matraces de 10 ml, una serie de muestras de TT8 de concentración $1,0 \cdot 10^{-5}$ M, en las condiciones óptimas ya establecidas anteriormente, pero a fuerzas iónicas

TABLA XIIESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES DE ITB CON EL TIEMPO

TIEMPO (minutos)	ABSORBANCIA A 412 nm
3	0,420
5	0,418
10	0,410
15	0,410
20	0,410
25	0,410
30	0,410
35	0,398
40	0,395
45	0,395
50	0,390
55	0,388
60	0,380

nicas distintas, conseguidas añadiendo cantidades crecientes de un electrolito fuerte (elegimos KCl). En la Tabla XIII se muestran las absorbancias correspondientes a la adición de distintos volúmenes de KCl 0,1 M. Se observa que la adición de un electrolito fuerte, con objeto de controlar la fuerza iónica del medio, no ejercería perturbación alguna en los valores de absorbancia, en todo el margen de cantidades añadidas que hemos estudiado.

III.3.4. Procedimiento

Una vez que se han fijado las condiciones óptimas, se recomienda el siguiente procedimiento para la determinación fotométrica del TTB:

TECNICA: En matraces aforados de 10 ml se ponen diferentes volúmenes de disolución de TTB de concentración $4,0 \cdot 10^{-4}$ M en acetona, se agrega 1 ml de HCl 0,1 N para obtener un pH final próximo a 2, y se lleva hasta la señal de enrase con agua destilada y acetona, de forma que nos quede una disolución acetona-agua 1:9. Se mide la absorbancia a 412 nm, a los 15 minutos, frente a un blanco idéntico pero sin TTB.

TABLA XIIIINFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA

KCl 0,1 M (ml)	ABSORBANCIA A 412 nm
0,0	0,415
0,5	0,412
1,0	0,417
1,5	0,410
2,0	0,415
3,0	0,411
4,0	0,408
5,0	0,412

III.3.5. Cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer

Con el procedimiento propuesto anteriormente, se preparan una serie de muestras en las que se varía la can- ti- dad de TTB de forma creciente y paulatina, y medimos las ab- sor- bancias de las disoluciones a 412 nm (Tabla XIV).

Normalmente, las gráficas de calibración uti- li- za- das en las determinaciones espectrofotométricas, se obtie- nen representando las absorbancias medidas frente a las con- cen- traciones conocidas, y trazando una línea recta que pase - por dichos puntos. Sin embargo, cuando existen desviaciones - de la ley de Beer, este modo de construir las gráficas puede dar lugar a errores sistemáticos en los resultados de la de- ter- minación de una concentración desconocida a partir de una ab- sor- bancia medida. Estos errores pueden evitarse analizando estadísticamente los datos de la gráfica, mediante un "test" que nos permita detectar las desviaciones de la ley de Beer, y que consiste en el ensayo, por un procedimiento estadístico matemático, de la linealidad de la regresión (22).

En este test, la hipótesis nula es que la línea trazada a través de los puntos puede representarse por una - línea recta (o una ecuación lineal), es decir, se establece -- que la varianza sobre la regresión no difiere de la varianza entre grupos (23). Sobre la base del cociente de estas varian- zas, se determina si la hipótesis nula debe rechazarse o no.

La ecuación de la gráfica se calcula de acuer- do con el método de los mínimos cuadrados, resultando una re-

TABLA XIV

CUMPLIMIENTO DE LA LEY DE LAMBERT-BEER

CONCENTRACION	ABSORBANCIA				W	A
$0,4 \cdot 10^{-5}$	0,170	0,173	0,170	0,176	0,006	0,1722
$0,8 \cdot 10^{-5}$	0,358	0,357	0,335	0,350	0,023	0,3500
$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,425	0,411	0,430	0,432	0,021	0,4245
$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,516	0,511	0,501	0,502	0,015	0,5075
$1,4 \cdot 10^{-5}$	0,593	0,610	0,586	0,599	0,024	0,5970
$1,6 \cdot 10^{-5}$	0,680	0,688	0,675	0,675	0,013	0,6795

$$\bar{W} = 0,017$$

lación lineal

$$A = a \cdot C + b \quad (1)$$

donde A es la absorbancia y C la concentración. La varianza sobre la regresión, V_R , puede calcularse de acuerdo con

$$V_R = \frac{\sum (A_{\text{calc}} - A_{\text{med}})^2}{n-1}$$

donde A_{calc} es la absorbancia calculada a partir de concentraciones C conocidas, de acuerdo con la ecuación (1); A_{med} es la absorbancia medida realmente; y n es el número de niveles de C.

La varianza V_R se compara entonces con la varianza entre grupos, V_o , con la ayuda del test F. V_o se calcula a partir de la amplitud media, lo cual es menos preciso, pero mucho menos complicado que calcular V_o por un análisis completo de la varianza. Se determina la probabilidad que existe de que el valor de F encontrado se deba sólo al azar. Si esta probabilidad es menor del 5% ($P < 0,05$), la hipótesis nula se rechaza y deducimos que existen desviaciones de la linealidad.

En general, las gráficas de calibración espectrofotométricas suelen pasar por el origen, siempre que el blanco contenga todos los reactivos utilizados excepto el compuesto que se quiere determinar, y que se utilicen dos células de medida idénticas. Por esta razón, aplicaremos el test primeramente para una ecuación lineal sin ordenada en el origen:

$$A = a_1 \cdot C$$

En primer lugar, tendremos que ver si todos los valores medidos están bajo control. En caso afirmativo, se calcula la ecuación de la gráfica. Para una recta que pase por el origen, la pendiente, a_1 , viene dada por

$$a_1 = \frac{\sum c_i \cdot A_i}{\sum c_i^2}$$

En segundo lugar, se calculan V_R y V_O , y se aplica el test F al cociente de estas dos varianzas. Cuando las varianzas no difieren significativamente, es evidente que la relación lineal es una representación aceptable de la gráfica. Cuando, sin embargo, se detecta una diferencia significativa entre V_R y V_O , lo que implica que existen desviaciones de la ley de Beer, es necesario calcular la ecuación de la gráfica sobre la base de una función lineal con ordenada en el origen:

$$A = a_1 \cdot C + b_1$$

Si también en este caso se detectara una diferencia significativa entre V_R y V_O , habría que recurrir a calcular la ecuación de la gráfica según una función cuadrática

$$A = a_2 \cdot C^2 + b_2 \cdot C$$

III.3.5.1. Análisis de los datos de la recta de calibrado

Comenzamos por determinar si los datos experimentales de absorbancia están bajo control. Para ello, calcu-

lamos el límite superior de control para la amplitud

$$G = D_U \cdot \bar{W}$$

donde D_U es una constante que depende del número de medidas a cada nivel de C (k). Para $k=4$, $D_U = 2,26$ (22). Tomando este valor de D_U , existe una probabilidad del 0,5% de que la amplitud sea mayor que G.

$$G = 2,26 \cdot 0,017 = 0,039$$

Como todas las amplitudes son menores que este valor de G, debe concluirse que todas las absorbancias experimentales están bajo control.

A continuación, calculamos la ecuación de la gráfica sobre la base de una relación lineal sin intersección. En la Tabla XV se muestran los cálculos de la pendiente a_1 , y en la Figura 31 se representa la recta. Encontramos que

$$A = 42595 \cdot C \quad (2)$$

Sustituyendo en la ecuación (2), se determina A_{calc} para cada valor de C, y se calcula V_R a partir de estos valores y de las absorbancias promedio experimentales, \bar{A}_{med} (Tabla XVI):

$$V_R = 2,145 \cdot 10^{-5}$$

La varianza V_O se calcula a partir de la amplitud media, \bar{W} , y de un factor d_n que depende del número de medidas a cada nivel de C (para $k=4$, $d_n = 0,4857$):

$$V_O = (\bar{W} \cdot d_n)^2 = (0,017 \cdot 0,4857)^2 = 7,3906 \cdot 10^{-5}$$

TABLA XV

PENDIENTE DE LA RECTA DE CALIBRADO

C_i (mol/l)	A_i	$C_i \cdot A_i$	C_i^2
$0,4 \cdot 10^{-5}$	0,1722	$0,689 \cdot 10^{-6}$	$0,16 \cdot 10^{-10}$
$0,8 \cdot 10^{-5}$	0,3500	$2,800 \cdot 10^{-6}$	$0,64 \cdot 10^{-10}$
$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,4245	$4,245 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-10}$
$1,2 \cdot 10^{-5}$	0,5075	$6,090 \cdot 10^{-6}$	$1,44 \cdot 10^{-10}$
$1,4 \cdot 10^{-5}$	0,5970	$8,358 \cdot 10^{-6}$	$1,96 \cdot 10^{-10}$
$1,6 \cdot 10^{-5}$	0,6795	$10,872 \cdot 10^{-6}$	$2,56 \cdot 10^{-10}$

$$\Sigma C_i \cdot A_i = 33,054 \cdot 10^{-6}$$

$$\Sigma C_i^2 = 7,76 \cdot 10^{-10}$$

$$a_1 = \frac{\Sigma C_i^2 \cdot A_i}{\Sigma C_i^2} = \frac{33,054 \cdot 10^{-6}}{7,76 \cdot 10^{-10}} = 42,595 \cdot 10^3$$

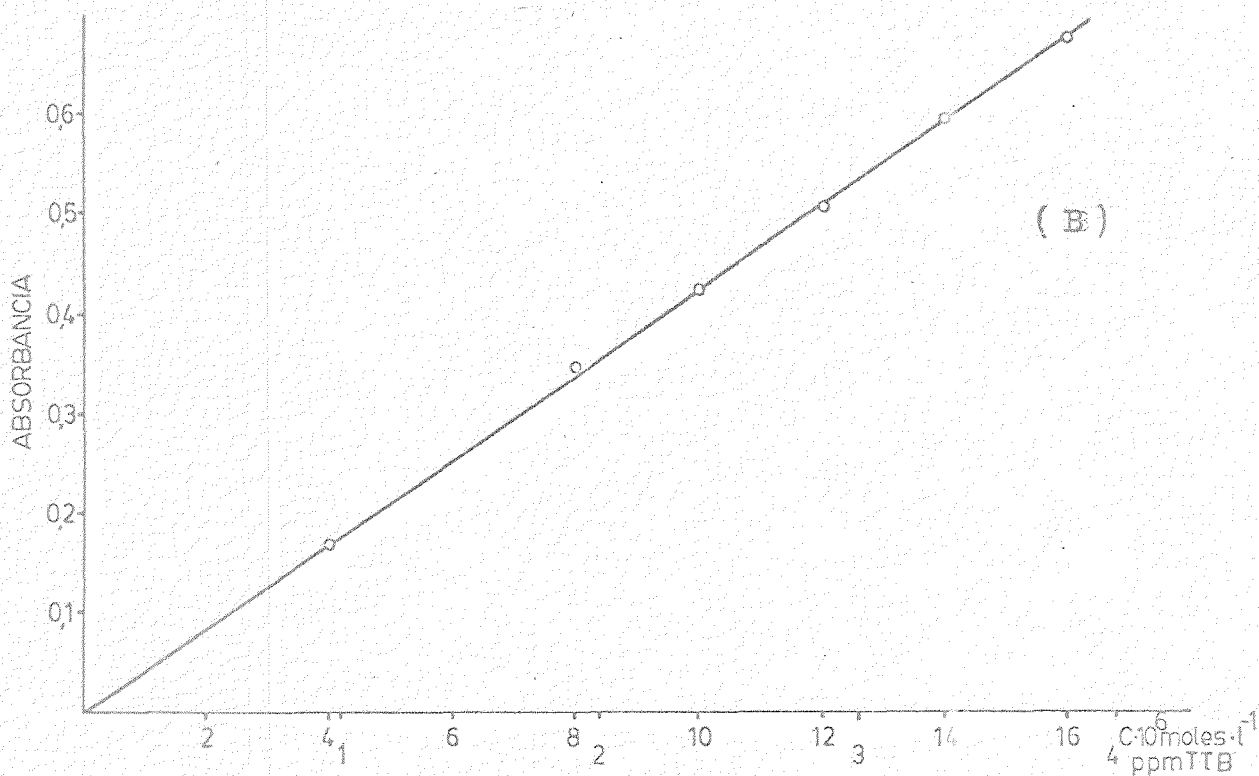
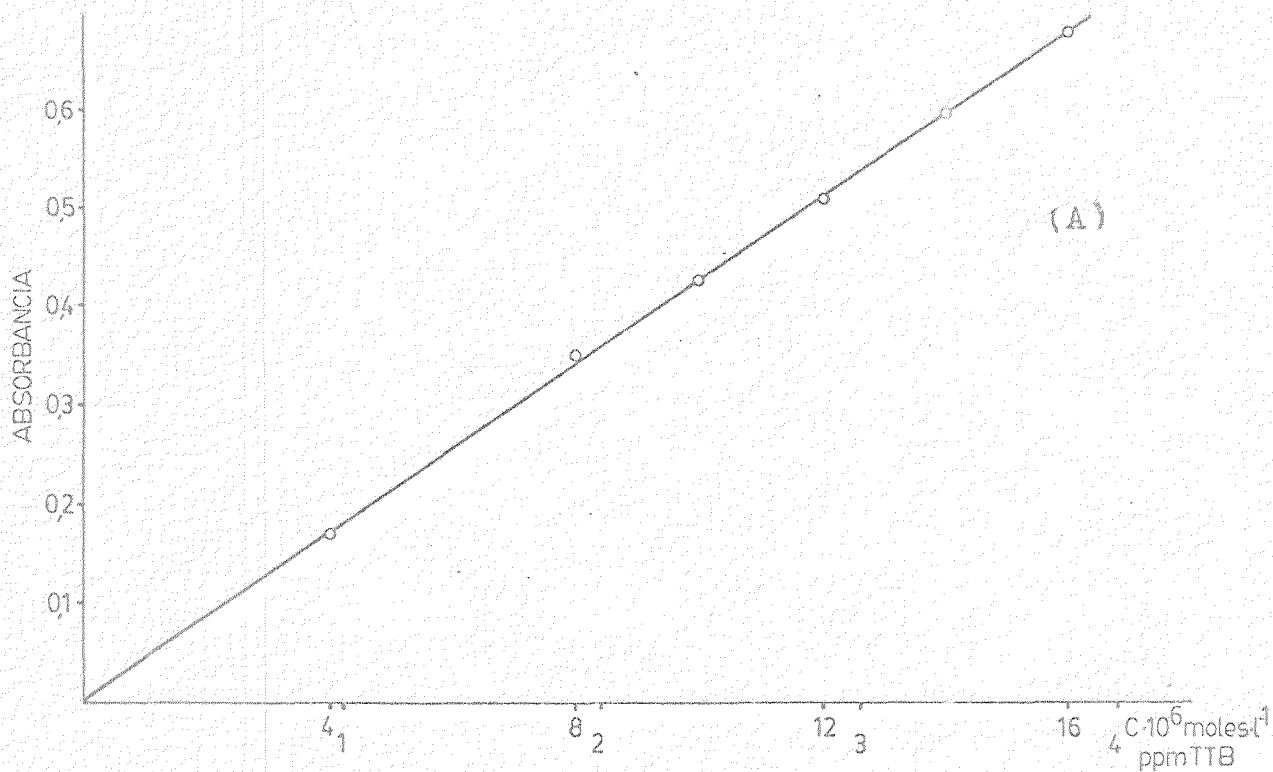


Fig.31.- Rectas de calibrado

A: representación de la recta de ecuación $A = 6,39 \cdot 10^{-3} + 42070 \cdot C$

B: representación de la recta de ecuación $A = 42595 \cdot C$

TABLA XVI

CALCULO DE V_R PARA LA RECTA SIN INTERSECCION

\bar{A}	A_{calc}	$\bar{A} - A_{\text{calc}}$	$(\bar{A} - A_{\text{calc}})^2$
0,1722	0,1704	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$3,24 \cdot 10^{-6}$
0,3500	0,3408	$9,2 \cdot 10^{-3}$	$84,64 \cdot 10^{-6}$
0,4245	0,4259	$-1,4 \cdot 10^{-3}$	$1,96 \cdot 10^{-6}$
0,5075	0,5111	$-3,6 \cdot 10^{-3}$	$12,96 \cdot 10^{-6}$
0,5970	0,5963	$-0,7 \cdot 10^{-3}$	$0,49 \cdot 10^{-6}$
0,6795	0,6815	$-2,0 \cdot 10^{-3}$	$4,00 \cdot 10^{-6}$

$$\sum (\bar{A} - A_{\text{calc}})^2 = 1,0725 \cdot 10^{-4}$$

$$V_R = \frac{\sum (\bar{A} - A_{\text{calc}})^2}{n-1} = \frac{1,0725 \cdot 10^{-4}}{5} = 2,145 \cdot 10^{-5}$$

A continuación, calculamos el valor de F:

$$F = \frac{V_R \cdot k}{V_O} = \frac{2,145 \cdot 10^{-5} \cdot 4}{7,3906 \cdot 10^{-5}} = 1,161$$

A este valor de F, que consultamos en la tabla de Snedecor (22), le corresponde una probabilidad superior al 5%, la cual hemos escogido como probabilidad mínima. Por lo tanto, no se detecta diferencia significativa entre V_R y V_O/k , por lo que concluimos que no existen desviaciones de la ley de Beer, y la recta de calibración puede expresarse por la ecuación (2).

A continuación, mediante el método de los mínimos cuadrados, calculamos la ecuación de la gráfica en base a una relación lineal con ordenada en el origen (Figura 31):

$$A = 6,39 \cdot 10^{-3} + 42070 \cdot C \quad (3)$$

A partir de esta ecuación, se obtiene A_{calc} para cada valor de C, y calculamos V_R (Tabla XVII).

En este caso, el valor de F es:

$$F = \frac{1,5934 \cdot 10^{-5} \cdot 4}{7,3906 \cdot 10^{-5}} = 0,8624$$

De este valor de F se deduce que no puede ser detectada una diferencia significativa entre V_R y V_O/k , y por lo tanto, puede aceptarse la ecuación (3) para la recta de calibrado.

Para demostrar que son válidas ambas ecuacio-

TABLA XVII

CALCULO DE V_R PARA LA RECTA CON INTERSECCION

\bar{A}	A_{calc}	$\bar{A} - A_{\text{calc}}$	$(\bar{A} - A_{\text{calc}})^2$
0,1722	0,1747	$-2,5 \cdot 10^{-3}$	$6,25 \cdot 10^{-6}$
0,3500	0,3429	$7,1 \cdot 10^{-3}$	$50,40 \cdot 10^{-6}$
0,4245	0,4271	$-2,6 \cdot 10^{-3}$	$6,76 \cdot 10^{-6}$
0,5075	0,5112	$-3,7 \cdot 10^{-3}$	$13,70 \cdot 10^{-6}$
0,5970	0,5954	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$2,56 \cdot 10^{-6}$
0,6795	0,6795	0	0

$$\Sigma (\bar{A} - A_{\text{calc}})^2 = 7,967 \cdot 10^{-5}$$

$$V_R = \frac{\Sigma (\bar{A} - A_{\text{calc}})^2}{n-1} = 1,5934 \cdot 10^{-5}$$

nes, comparamos los resultados obtenidos con cada una de ellas cuando las utilizamos para calcular la concentración de TTB a partir de valores de absorbancia elegidos arbitrariamente. Los resultados se muestran en la Tabla XVIII, donde se observa que el error es pequeño, especialmente para absorbancias superiores a 0,1.

III.3.6. Absortividad molar

Para el cálculo de la absortividad molar, utilizamos los datos de las rectas de calibrado, teniendo en cuenta su equivalencia con la expresión matemática de la ley de Lambert-Beer:

$$y = a \cdot x + b = A = \xi \cdot l \cdot C \quad (4)$$

donde,

y: valores de la función (con o sin ordenada en el origen).

a: pendiente de la recta de calibrado.

b: ordenada en el origen de la recta de calibrado.

x: valores de la variable independiente.

A: absorbancia.

ξ : absortividad molar ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

l: paso de luz de las cubetas (1,0 cm).

C: concentración en moles por litro.

TABLA XVIII

COMPARACION DE LAS RECTAS DE CALIBRADO

ABSORBANCIA	C ($A = a \cdot C$)	C ($A = a \cdot C + b$)	DIFERENCIA	DIFERENCIA EN %
0,1	$2,35 \cdot 10^{-6}$	$2,22 \cdot 10^{-6}$	0,13	5,53
0,2	$4,69 \cdot 10^{-6}$	$4,60 \cdot 10^{-6}$	0,09	1,92
0,3	$7,04 \cdot 10^{-6}$	$6,98 \cdot 10^{-6}$	0,06	0,85
0,4	$9,39 \cdot 10^{-6}$	$9,36 \cdot 10^{-6}$	0,03	0,32
0,5	$11,74 \cdot 10^{-6}$	$11,73 \cdot 10^{-6}$	0,01	0,08
0,6	$14,09 \cdot 10^{-6}$	$14,11 \cdot 10^{-6}$	-0,02	0,14
0,7	$16,44 \cdot 10^{-6}$	$16,49 \cdot 10^{-6}$	-0,05	0,30

Despejando ϵ de la expresión (4) obtenemos -- los siguientes valores para la absorptividad molar del TTB a 412 nm:

$$\epsilon_{412} = 4,26 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad (A = 42595 \cdot C)$$

$$\epsilon_{412} = 4,28 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad (A = 6,39 \cdot 10^{-3} + 42070 \cdot C)$$

III.3.7. Precisión del método fotométrico

Si efectuamos de forma reiterada, y en idénticas condiciones, una medida experimental de una determinada -- propiedad con valor analítico (en nuestro caso, absorptividad), obtendremos una serie de resultados que diferirán ligeramente entre sí. Estas variaciones se deben al hecho de que es -- imposible mantener constantes los infinitos factores que in-- fluyen en los resultados, dando lugar a lo que conocemos co -- mo error indeterminado o accidental.

En nuestro caso, determinamos las absorptividades de once muestras de TTB de concentración $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ prepara-- das de idéntica forma. Los resultados se muestran en la Ta -- bla XIX.

III.3.7.1. Tendencia central

Para caracterizar la tendencia central de un muestreo se pueden emplear varios parámetros. El más común -- es la media aritmética:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i = \frac{4,658}{11} = 0,4234$$

TABLA XIXPRECISION DEL METODO FOTOMETRICO

ABSORBANCIA (X)	$X - \bar{X}$	$(X - \bar{X})^2$
0,423	$-0,4 \cdot 10^{-3}$	$0,16 \cdot 10^{-6}$
0,419	$-4,4 \cdot 10^{-3}$	$19,36 \cdot 10^{-6}$
0,437	$13,6 \cdot 10^{-3}$	$184,96 \cdot 10^{-6}$
0,427	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$12,96 \cdot 10^{-6}$
0,424	$0,6 \cdot 10^{-3}$	$0,36 \cdot 10^{-6}$
0,410	$-13,4 \cdot 10^{-3}$	$179,56 \cdot 10^{-6}$
0,422	$-1,4 \cdot 10^{-3}$	$1,96 \cdot 10^{-6}$
0,419	$-4,4 \cdot 10^{-3}$	$19,36 \cdot 10^{-6}$
0,423	$-0,4 \cdot 10^{-3}$	$0,16 \cdot 10^{-6}$
0,425	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$2,56 \cdot 10^{-6}$
0,429	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$31,36 \cdot 10^{-6}$

$$\sum X = 4,658$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n} = \frac{4,658}{11} = 0,4234$$

$$\sum (X - \bar{X})^2 = 4,53 \cdot 10^{-4}$$

Otra característica de la tendencia central es la mediana. Se denomina así a un valor tal que tiene tantos superiores como inferiores. En nuestro caso,

$$Me = 0,423$$

III.3.7.2. Dispersión

La manera más simple de describir la dispersión en torno al valor central es mediante la amplitud:

$$W = x_{\text{máx}} - x_{\text{mín}} = 0,437 - 0,410 = 0,027$$

Otra forma más adecuada de expresar la dispersión es mediante la varianza o mediante la desviación estándar:

$$V = S^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{4,53 \cdot 10^{-4}}{10} = 4,53 \cdot 10^{-5}$$

$$S = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = \pm 6,73 \cdot 10^{-3}$$

También se puede recurrir al coeficiente de variación, que es la desviación estándar expresada en tanto por ciento con relación a la media:

$$c.v. = \frac{100 \cdot S}{\bar{x}} = 1,6\%$$

La desviación estándar de la media viene dada por:

$$S_m = \pm \frac{S}{\sqrt{n}} = \pm \frac{6,73 \cdot 10^{-3}}{\sqrt{11}} = \pm 2,03 \cdot 10^{-3}$$

El tanto por ciento de error de la media se calcula mediante la expresión:

$$\% \text{ Error} = \pm \frac{100 \cdot t \cdot S_m}{\bar{x}} = \pm \frac{100 \cdot 2,23 \cdot 2,03 \cdot 10^{-3}}{0,4234} = \pm 1,07 \%$$

siendo "t" un parámetro que depende del límite de confianza fijado y de n-1 grados de libertad. Fijando como límite de confianza el 95%, el valor de "t" para diez grados de libertad es 2,23.

III.3.8. Seguridad del método fotométrico

Para determinar el intervalo de concentraciones dentro del cual se comete el mínimo error, preparamos una serie de muestras con distintas concentraciones de TTB según el esquema general, y construimos el gráfico de Ringbom (24), representando el porcentaje de transmitancia frente al logaritmo decimal de la concentración (Tabla XX y Figura 32).

Se deduce que la zona de mínimo error, y por tanto de máxima seguridad, para la determinación fotométrica de TTB está comprendida entre $6 \cdot 10^{-6}$ y $1,2 \cdot 10^{-5}$ moles/litro.

TABLA XXSEGURIDAD DEL METODO FOTOMETRICO

C (mol/l)	A	% TRANSMISION	log C
$4 \cdot 10^{-6}$	0,163	68,71	-5,398
$6 \cdot 10^{-6}$	0,244	57,02	-5,222
$8 \cdot 10^{-6}$	0,330	46,77	-5,097
$10 \cdot 10^{-6}$	0,420	38,02	-5,000
$12 \cdot 10^{-6}$	0,514	30,62	-4,921
$14 \cdot 10^{-6}$	0,585	26,00	-4,854
$16 \cdot 10^{-6}$	0,651	22,34	-4,796
$18 \cdot 10^{-6}$	0,738	18,28	-4,745
$20 \cdot 10^{-6}$	0,809	15,52	-4,699

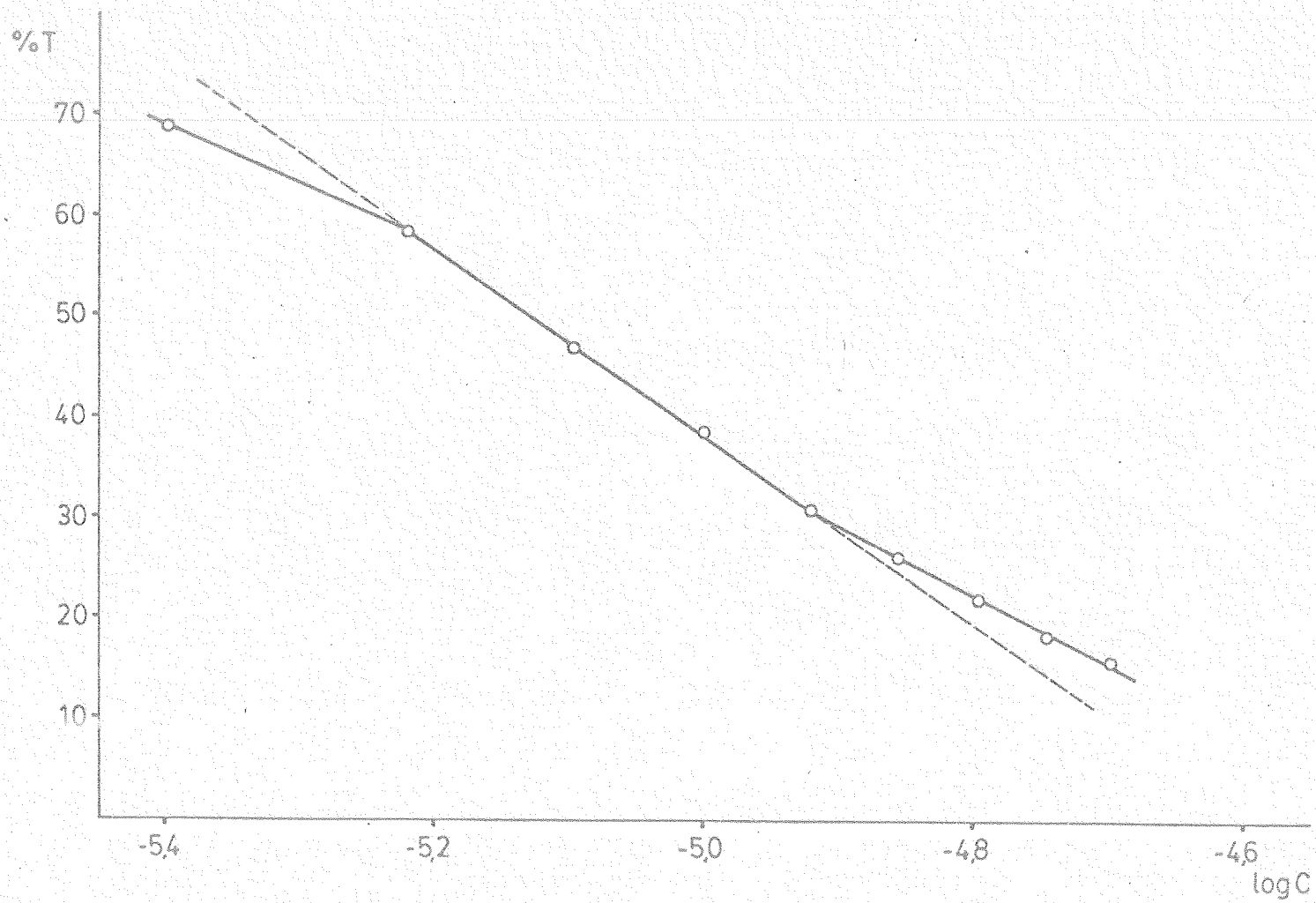


Fig.32. - Gráfico de Ringbom

CAPITULO IV

EXTRACCION DEL TTB CON DISOLVENTES

Una sustancia se distribuye entre dos líquidos inmiscibles (por ejemplo, agua y un solvente orgánico adecuado) aproximadamente en la relación de sus solubilidades en cada uno de ellos. Si, una vez alcanzado el equilibrio, su concentración es mucho mayor en la fase orgánica que en la acuosa, puede hacerse uso analítico de este comportamiento para concentrar la sustancia en un pequeño volumen del líquido orgánico y, lo que es más importante, para separarla de sustancias que no se distribuyan análogamente, y cuya presencia no nos interese.

El estudio de las posibilidades de extracción del TTB en los dos disolventes más comúnmente usados (cloroformo y éter) se aborda en este capítulo.

La extracción es un método de separación que puede aislar el barbitúrico de sustancias neutras y básicas que lo acompañen o contaminen. Disolviendo la muestra impura en NaOH acuoso y extrayendo con éter o cloroformo, no pasaría a la fase orgánica el barbiturato, que quedaría en la fase acuosa.

Por otro lado, la extracción en medio ácido fuerte, combinada con la posterior pesada del residuo, después de evaporar el disolvente orgánico, sirve como método estándar en la determinación gravimétrica de los barbitúricos en general.

IV.1. pH ÓPTIMO DE EXTRACCIÓN

Para determinar experimentalmente el pH óptimo de extracción, procedemos de acuerdo con la siguiente técnica:

TECNICA: 10,0 ml de disoluciones acuoso-orgánicas (acetona-agua 1:9) de TTB $4,0 \cdot 10^{-5}$ M a distintos pH, coseguidos con disoluciones de HCl o de NaOH de distintas concentraciones, se colocan en un embudo de decantación de 100 ml. Se añaden 10,0 ml del disolvente orgánico (cloroformo, éter) y se agita durante dos minutos, procurando que la emulsión entre las dos fases sea efectiva. Se dejan decantar y luego se separa la fase acuosa. Esta fase acuosa separada se acidula con una gota de HCl 6 N, de manera que el pH esté entre 1 y 2, y se lleva a la cubeta de 1 cm de paso de luz, midiéndose la absorbancia a 412 nm, a los 15 minutos, frente a un blanco sin TTB que ha seguido el mismo proceso de extracción.

En las Tablas XXI y XXII se ofrecen los datos obtenidos, y en las Figuras 33 y 34 se representa la variación de los datos de transmitancia con el pH. De estos valores se puede deducir:

- Con éter, el rendimiento de la extracción alcanza un valor máximo y prácticamente invariable en medio ácido, hasta pH 5, en que comienza un descenso brusco.
- Con cloroformo, se obtienen resultados similares a los ya comentados con éter. Se mantiene un valor máximo en el rendimiento de la extracción a valores de pH ácidos hasta llegar a pH 4,5. Sin embargo, se aprecia que la recuperación es prácticamente completa en este caso.

IV.2. INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA

Es interesante conocer cómo se modifica la extracción de una sustancia con la concentración de electrolito indiferente en la fase acuosa. Muchas veces, la solubilidad de una sustancia no ionizable es más pequeña en una solución acuosa de electrolito (sal) que en agua. Esto es lo que se denomina efecto salino desplazante, que se atribuye a que las moléculas de agua son retiradas por hidratación de los iones del electrolito, y que puede utilizarse para aumentar el rendimiento de la extracción.

Para realizar este estudio, en matraces de 10

TABLA XXIESTUDIO DEL pH OPTIMO DE EXTRACCION CON ETER

pH	ABSORBANCIA	% TRANSMISION
1,12	0,020	95,49
1,87	0,022	95,06
2,60	0,025	94,41
3,31	0,020	95,49
4,16	0,026	94,19
4,96	0,020	95,49
5,52	0,050	89,12
5,82	0,320	47,86
6,10	0,660	21,88
6,41	0,980	10,47
6,97	1,200	6,31
7,11	1,200	6,31
7,41	1,230	5,89
8,45	1,130	7,41
10,40	1,300	5,01

TABLA XXIIESTUDIO DEL pH OPTIMO DE EXTRACCION CON CLOROFORMO

pH	ABSORBANCIA	% TRANSMISION
1,84	0,000	100,00
2,10	0,002	99,54
2,21	0,000	100,00
2,50	0,005	98,85
3,95	0,000	100,00
4,30	0,005	98,85
5,14	0,090	81,28
5,60	0,420	38,02
6,12	0,900	12,59
9,05	1,450	3,55

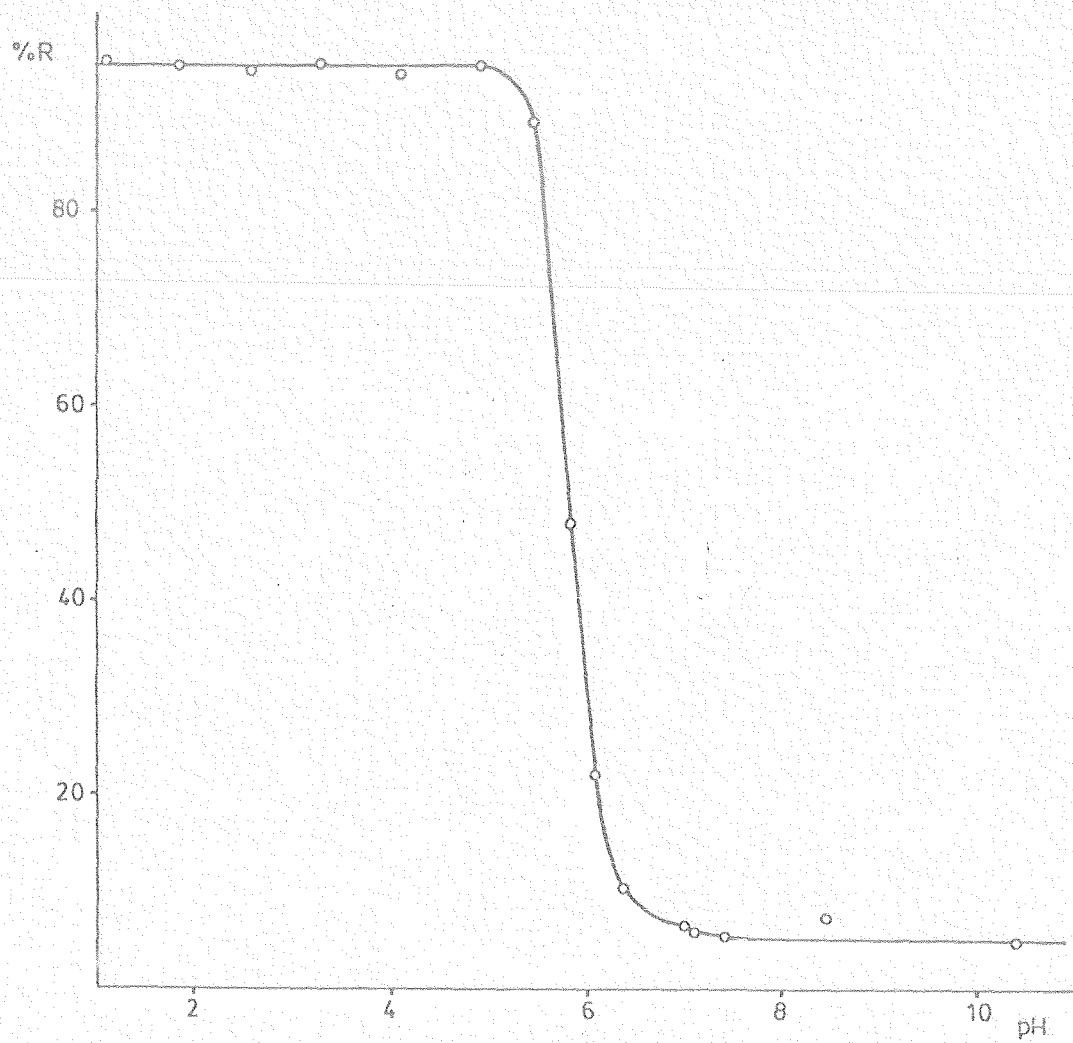


Fig.33.- Extracción con éter: curva transmitancia-pH

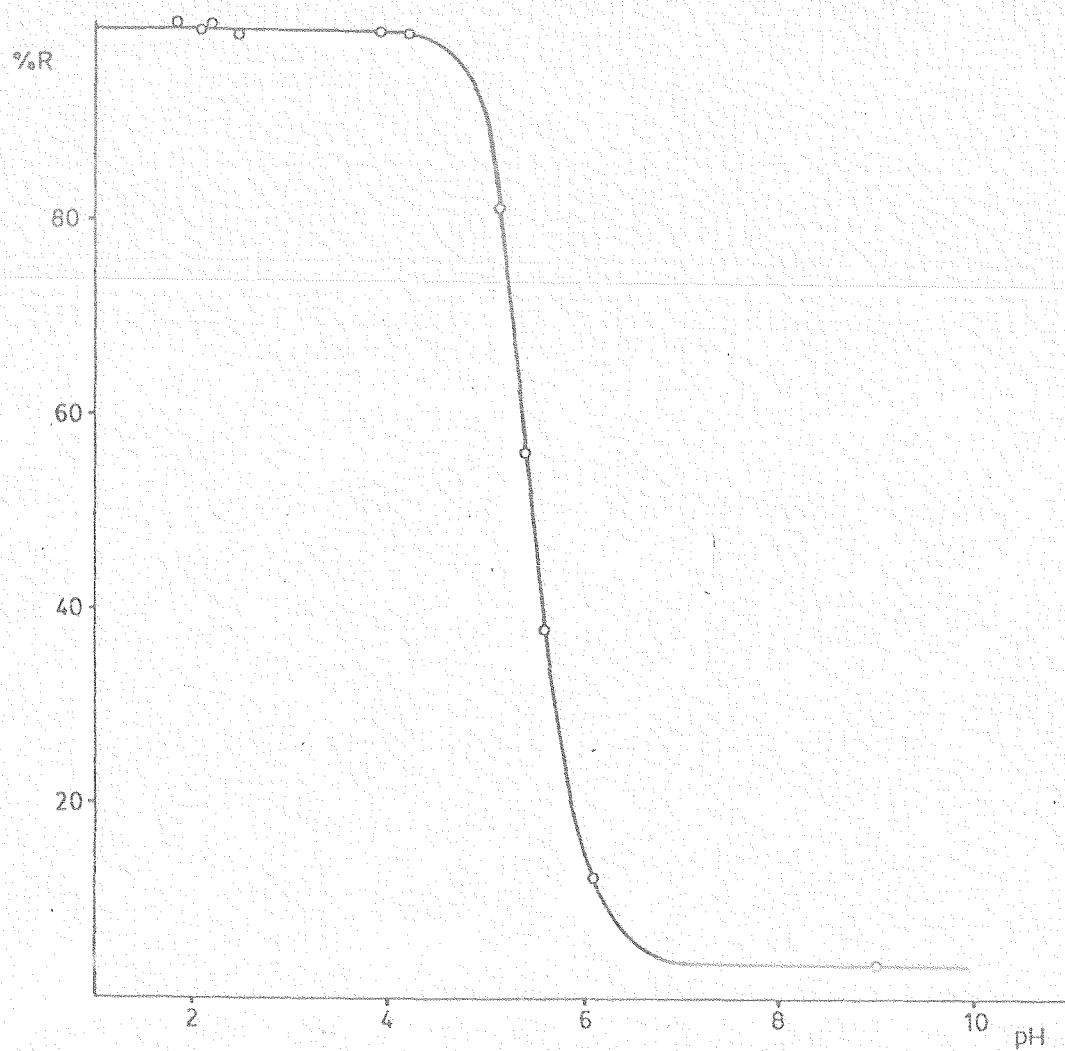


Fig.34.- Extracción con cloroformo: curva transmitancia-pH

ml ponemos 1,0 ml de disolución en acetona de TTB $1,0 \cdot 10^{-4}$ M, añadimos 1,0 ml de HCl 1N para acondicionar el pH, y distintos volúmenes de CLK 1M, enrasando con agua destilada. Extraemos en embudo de decantación con 10 ml del disolvente orgánico (tiempo de agitación, 2 minutos) y, una vez separada la fase orgánica, la evaporamos a sequedad. Disolvemos el residuo en 1 ml de acetona y añadimos 1 ml de HCl 0,1 N y agua destilada suficiente para 10,0 ml. Se mide la absorbancia a 412 nm, a los 15 minutos, frente a un blanco sin TTB.

Los resultados obtenidos se encuentran en las Tablas XXIII y XXIV. De ellos se deduce que el incremento de la fuerza iónica no aumenta significativamente el rendimiento de la extracción, tanto con éter como con cloroformo.

IV.3. ISOTERMA DE PARTICION

Cuando una sustancia se agita con dos solventes inmiscibles, se distribuye entre ellos según una razón constante, que es característica de la sustancia y de los solventes empleados, a una temperatura dada:

$$\frac{\text{Concentración en el solvente A}}{\text{Concentración en el solvente B}} = \frac{C_A}{C_B} = D$$

La constante D se conoce como coeficiente de distribución, y varía con la temperatura. Para determinarlo, utilizamos la siguiente técnica:

TABLA XXIII

INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA EN LA EXTRACCION CON ETHER

ml ClK IM	FUERZA IONICA	ABSORBANCIA		\bar{A}	C (moles/l)
0,0	0,1	0,330	0,346	0,338	$8,05 \cdot 10^{-6}$
2,0	0,3	0,344	0,335	0,339	$8,07 \cdot 10^{-6}$
4,0	0,5	0,328	0,342	0,335	$7,98 \cdot 10^{-6}$
8,0	0,9	0,348	0,339	0,344	$8,19 \cdot 10^{-6}$

TABLA XXIV

INFLUENCIA DE LA FUERZA IONICA EN LA EXTRACCION CON CLOROPORMO

ml ClK IM	FUERZA IONICA	ABSORBANCIA		\bar{A}	C (moles/l)
0,0	0,1	0,383	0,388	0,385	$9,18 \cdot 10^{-6}$
2,0	0,3	0,392	0,376	0,384	$9,14 \cdot 10^{-6}$
4,0	0,5	0,390	0,383	0,386	$9,20 \cdot 10^{-6}$
8,0	0,9	0,376	0,380	0,378	$9,00 \cdot 10^{-6}$

TECNICA: En un embudo de decantación de 100 ml, se ponen 10,0 ml de disoluciones acuoso-orgánicas (acetona-agua 1:9) de TT8 de distintas concentraciones, a un pH ácido. Se añaden 10,0 ml del disolvente orgánico y se agita durante 2 minutos. Se dejan decantar las fases, se separan y se evapora hasta sequedad el extracto orgánico. El residuo obtenido se disuelve en un volumen total de 2,5 ml de acetona, se añade una gota de HCl 6N y cantidad suficiente de agua destilada para enrasar en matraz aforado de 25 ml. Se mide la absorbancia a 412 nm, a los 15 minutos, frente a un blanco adecuado.

En las Tablas XXV y XXVI se ofrecen los resultados obtenidos, y en las Figuras 35 y 36 representamos las isotermas de partición (20° C) para la distribución del TT8 entre éter y agua, y entre cloroformo y agua, respectivamente, en una relación de volúmenes $U = V_{org}/V_{aq} = 10/10 = 1$.

Después de analizar los datos de la regresión concluimos que las razones de distribución son:

$$D_{\text{éter}} = \frac{C_{\text{éter}}}{C_{\text{aq}}} = 4,5$$

$$D_{\text{clorf}} = \frac{C_{\text{clorf}}}{C_{\text{aq}}} = 9,9$$

TABLA XV.

ISOTERMA DE PARTICION ETHER-AGUA (1:1)

C_T (moles/l)	ABSORBANCIA	C_{org} (moles/l)	$C_T - C_{org}$ (moles/l)
$16,0 \cdot 10^{-6}$	0,550	$13,10 \cdot 10^{-6}$	$29,0 \cdot 10^{-7}$
$14,4 \cdot 10^{-6}$	0,490	$11,67 \cdot 10^{-6}$	$27,3 \cdot 10^{-7}$
$12,8 \cdot 10^{-6}$	0,445	$10,59 \cdot 10^{-6}$	$22,0 \cdot 10^{-7}$
$11,2 \cdot 10^{-6}$	0,387	$9,21 \cdot 10^{-6}$	$19,9 \cdot 10^{-7}$
$8,0 \cdot 10^{-6}$	0,269	$6,40 \cdot 10^{-6}$	$15,9 \cdot 10^{-7}$
$5,6 \cdot 10^{-6}$	0,191	$4,55 \cdot 10^{-6}$	$10,5 \cdot 10^{-7}$
$3,2 \cdot 10^{-6}$	0,110	$2,62 \cdot 10^{-6}$	$5,8 \cdot 10^{-7}$
$1,6 \cdot 10^{-6}$	0,055	$1,31 \cdot 10^{-6}$	$2,9 \cdot 10^{-7}$

TABLA XXVI

ISOTERMA DE PARTICION CLOROFORMO-AGUA (1:1)

C_T (moles/l)	ABSORBANCIA	C_{org} (moles/l)	$C_T - C_{org}$ (moles/l)
$16,0 \cdot 10^{-6}$	0,610	$14,52 \cdot 10^{-6}$	$14,8 \cdot 10^{-7}$
$11,2 \cdot 10^{-6}$	0,428	$10,19 \cdot 10^{-6}$	$10,1 \cdot 10^{-7}$
$9,6 \cdot 10^{-6}$	0,365	$8,69 \cdot 10^{-6}$	$9,1 \cdot 10^{-7}$
$6,4 \cdot 10^{-6}$	0,240	$5,71 \cdot 10^{-6}$	$6,9 \cdot 10^{-7}$
$3,2 \cdot 10^{-6}$	0,123	$2,93 \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^{-7}$
$1,6 \cdot 10^{-6}$	0,060	$1,43 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$

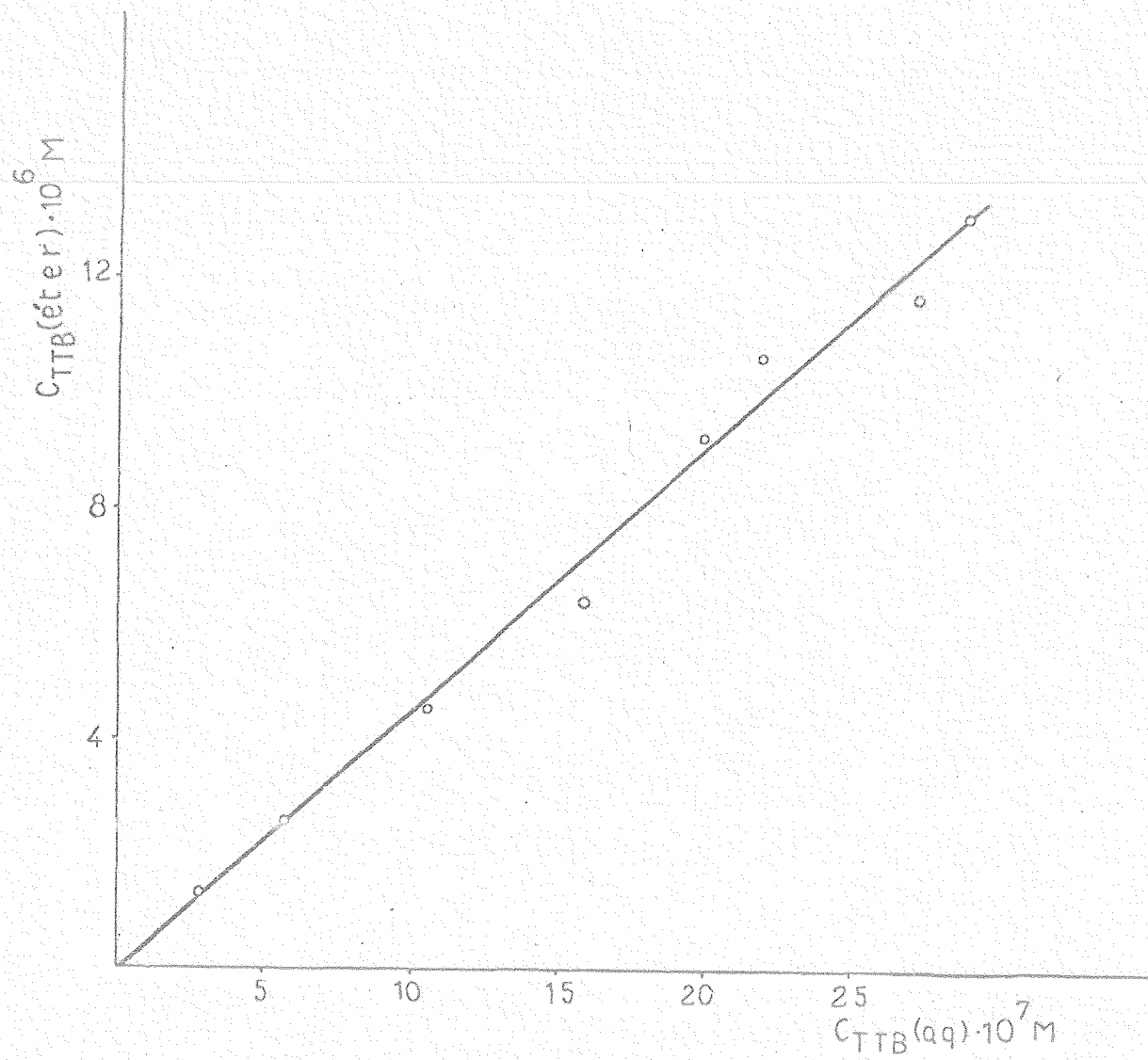


Fig.35.- Isoterma de partición éter-agua (1:1)

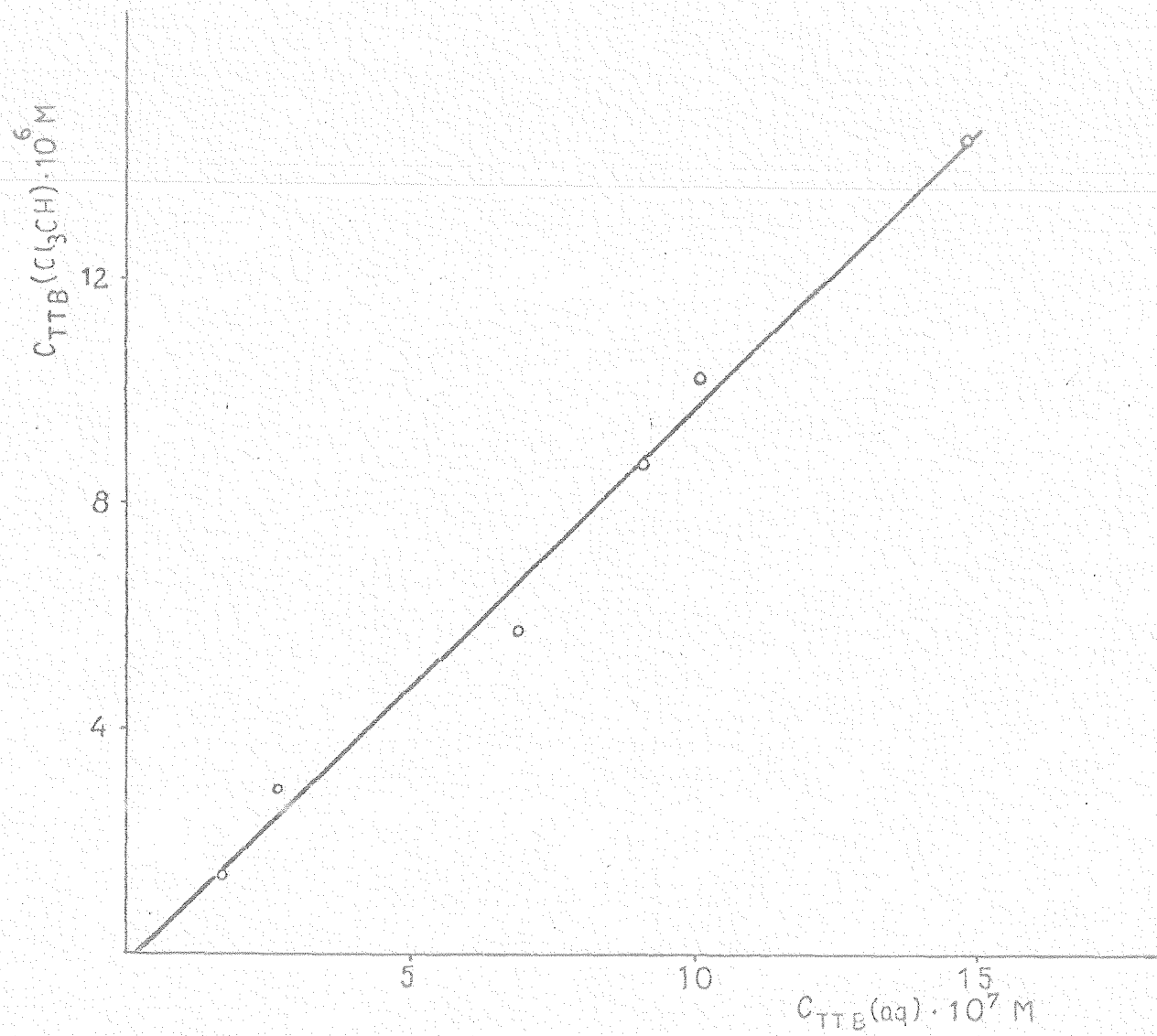


Fig.36.- Isoterma de partición cloroformo-agua (1:1)

IV.4. FACTOR DE RECUPERACION

Un factor de importancia fundamental en las separaciones en química analítica es el alcance de la recuperación del constituyente deseado en la muestra que es sometida al procedimiento separativo.

La recuperación del constituyente A se expresa cuantitativamente por el factor de recuperación R_A :

$$R_A = \frac{Q_A}{(Q_A)_0}$$

donde $(Q_A)_0$ es la cantidad de A en la muestra tomada, y Q_A es la cantidad aislada de A. Si se desea, este cociente puede multiplicarse por 100 para dar el porcentaje de recuperación.

Los valores de R_A requeridos usualmente en análisis cuantitativo dependen de la cantidad relativa de A en la muestra. Cuando A es un constituyente mayoritario, R_A debe ser por lo menos 0,999; para contenidos de A muy bajos (0,001-0,0001 %) puede aceptarse un $R_A \geq 0,95$ (25).

IV.4.1. Extracción simple

Se determina en primer lugar el factor de recuperación de la extracción simple con éter y con cloroformo respectivamente.

Para ello, en un embudo de decantación de 100

ml se colocan 10,0 ml de disoluciones acuoso-orgánicas (acetona-agua 1:9) de TTB $1,0 \cdot 10^{-4}$ M a pH ácido, y se agitan durante 2 minutos con 10,0 ml del disolvente orgánico. Después de separar la fase orgánica, se evapora a sequedad y se disuelve el residuo en 1 ml de acetona, se añade 1 ml de HCl 0,1 N y se completa hasta 10,0 ml con agua destilada.

Se mide la absorbancia a 412 nm, a los 15 minutos, frente a un blanco apropiado. Los resultados, incluyendo la desviación estándar, el porcentaje de error de la media y el porcentaje de recuperación, se ofrecen en las Tablas XXVII y XXVIII. Se aprecia una recuperación mayor para el caso de la extracción con cloroformo, aunque no llega a ser cuantitativa.

IV.4.2. Extracción doble

Con el fin de mejorar el factor de recuperación, se intenta la extracción doble, manteniendo el volumen total de extractante (10,0 ml) y el tiempo total de agitación (2 minutos). Para ello, se procede igual que en el caso anterior, pero realizando dos extracciones con 5 ml de disolvente orgánico, y un tiempo de agitación de un minuto en cada una de ellas.

En las Tablas XXIX y XXX se muestran los resultados obtenidos, observándose un incremento apreciable en el porcentaje de recuperación, sobre todo para la extracción con cloroformo, que puede considerarse cuantitativa.

TABLA XXVIIFACTOR DE RECUPERACION. EXTRACCION SIMPLE CON ETHER

ABSORBANCIA	CONCENTRACION (moles/l)
0,323	$7,69 \cdot 10^{-6}$
0,315	$7,50 \cdot 10^{-6}$
0,314	$7,48 \cdot 10^{-6}$
0,350	$8,33 \cdot 10^{-6}$
0,352	$8,38 \cdot 10^{-6}$
0,371	$8,83 \cdot 10^{-6}$
0,334	$7,95 \cdot 10^{-6}$
0,345	$8,21 \cdot 10^{-6}$
0,373	$8,88 \cdot 10^{-6}$
0,365	$8,69 \cdot 10^{-6}$
0,346	$8,24 \cdot 10^{-6}$

CONCENTRACION PROMEDIO: $8,20 \cdot 10^{-6}$

DESVIACION ESTANDAR: $4,981 \cdot 10^{-7}$

% ERROR DE LA MEDIA: 4,08

% RECUPERACION: 82,0

TABLA XXVIIIFACTOR DE RECUPERACION. EXTRACCION SIMPLE CON CLOROFORMO

ABSORBANCIA	CONCENTRACION (moles/l)
-------------	-------------------------

0,381	$9,07 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,390	$9,29 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,370	$8,81 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,403	$9,59 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,363	$8,64 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,392	$9,33 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,407	$9,69 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,375	$8,93 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,380	$9,05 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,379	$9,02 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,396	$9,43 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

CONCENTRACION PROMEDIO: $9,17 \cdot 10^{-6}$

DESVIACION ESTANDAR: $3,270 \cdot 10^{-7}$

% ERROR DE LA MEDIA: 2,40

% RECUPERACION: 91,7

TABLA XXIXFACTOR DE RECUPERACION. EXTRACCION DOBLE CON ETHER

ABSORBANCIA	CONCENTRACION (moles/l)
-------------	-------------------------

0,358	$8,52 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,343	$8,17 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,365	$8,69 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,371	$8,83 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,360	$8,57 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,345	$8,21 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,352	$8,38 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,374	$8,90 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,368	$8,76 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,337	$8,02 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,362	$8,62 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

CONCENTRACION PROMEDIO: $8,51 \cdot 10^{-6}$

DESVIACION ESTANDAR: $2,877 \cdot 10^{-7}$

% ERROR DE LA MEDIA: 2,27

% RECUPERACION: 85,1

TABLA XXXFACTOR DE RECUPERACION. EXTRACCION DOBLE CON CLOROFORMO

ABSORBANCIA	CONCENTRACION (moles/l)
-------------	-------------------------

0,394	$9,38 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,418	$9,95 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,408	$9,71 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,415	$9,88 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,396	$9,43 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,388	$9,24 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,415	$9,88 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,424	$10,09 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,418	$9,95 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,412	$9,81 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,405	$9,64 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

CONCENTRACION PROMEDIO: $9,72 \cdot 10^{-6}$

DESVIACION ESTANDAR: $2,731 \cdot 10^{-7}$

% ERROR DE LA MEDIA: 1,89

% RECUPERACION: 97,2

IV.4.3. Extracción triple

A pesar de que la extracción doble con cloroformo es prácticamente cuantitativa, intentamos la extracción triple con este disolvente para conseguir una recuperación total. Se realizan 3 extracciones con 5 ml de cloroformo, agitando durante 2 minutos en cada una de ellas.

Los resultados se ofrecen en la Tabla XXXI, de los que podemos deducir la eficacia conseguida en el proceso de separación por extracción del TT8.

TABLA XXXIFACTOR DE RECUPERACION, EXTRACCION TRIPLE CON CLOROFORMO

ABSORBANCIA	CONCENTRACION (moles/l)
-------------	-------------------------

0,422	$10,05 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,403	$9,59 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,414	$9,89 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,427	$10,17 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,428	$10,19 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,420	$10,00 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,408	$9,71 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,430	$10,24 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,430	$10,24 \cdot 10^{-6}$
-------	-----------------------

0,408	$9,71 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

0,419	$9,98 \cdot 10^{-6}$
-------	----------------------

CONCENTRACION PROMEDIO: $9,98 \cdot 10^{-6}$

DESVIACION ESTANDAR: $2,295 \cdot 10^{-7}$

% ERROR DE LA MEDIA: 1,55

% RECUPERACION: 99,8

RESUMEN Y CONCLUSIONES

FINALES

RESUMEN Y CONCLUSIONES FINALES

- 1.- Se ha sintetizado el ácido 5-(2-tiofen) metilen-2-tiobarbitúrico (TTB), del que se realiza un estudio físico-químico y analítico con vistas a su posible utilización farmacológica. El análisis elemental coincide con los cálculos teóricos, mostrándose de acuerdo con la fórmula empírica $C_9H_6N_2S_2O_2$.
- 2.- El TTB es un producto amarillo amorfo que presenta un punto de fusión superior a 300°C. Se ha ensayado la solubilidad en varios disolventes, destacando la solubilidad en disoluciones acuosas alcalinas, así como en disolventes no acuosos con carácter protofílico, como la N,N'-dimetilformamida y el dioxano; así mismo, se solubiliza en las mezclas alcohólico-glicólicas.
- 3.- El espectro infrarrojo y el espectro de masas están de acuerdo con las agrupaciones atómicas y la estructura que posee la molécula. Los espectros de absorción U.V.-visible en medio acuoso muestran un máximo a 412 nm a pH ácido, que sufre un desplazamiento hipsocrómico hasta 265 nm a pH neutro, y hasta 285 nm a pH alcalino, al tiempo que el compuesto cambia de color amarillo a incoloro. Los cambios espectrales se explican por las variaciones estructurales que lleva consigo la desprotonización de los nitrógenos del anillo de tiobarbitúrico. Los disolventes más polares, como agua y etanol, provocan un desplazamiento hacia el visible del máximo de absorción, desde 390 nm

en acetona, hasta 412 nm en agua.

4.- El estudio de la influencia del pH sobre el TTB demuestra la existencia de tres formas en disolución y dos constantes de ionización. Se han determinado estas constantes por los métodos de Hildebrand y Reilley, de Sommer y de Hammet, basados todos en la medida simultánea del pH y la absorbancia. Los valores obtenidos por los distintos métodos son concordantes:

método de Hildebrand y Reilley

$$pK_1 = 6,43 \pm 0,10$$

$$pK_2 = 13,21 \pm 0,10$$

método de Sommer

$$pK_1 = 6,50 \pm 0,10$$

$$pK_2 = 13,17 \pm 0,10$$

método de Hammet

$$pK_1 = 6,52 \pm 0,10$$

$$pK_2 = 13,46 \pm 0,10$$

5.- Llevamos a cabo una serie de estudios espectrofotométricos y térmicos con objeto de comprobar la estabilidad del TTB en disolución, en distintos medios de pH y también en estado sólido. Las disoluciones acuosas de TTB en medio ácido no son muy estables, salvo un pequeño período de estabilidad, a partir de los 15 minutos en medio ácido fuerte y en el primer cuarto de hora en medio dé-

bilmente ácido; en medios neutro y alcalino las disoluciones de TT8 son más estables. El TT8, en estado sólido, es estable a 110 y 150°C, pero a partir de 200°C parece descomponerse ligeramente. En presencia de oxidantes, el máximo de absorción a 412 nm sufre un descenso paulatino (más rápido en medio débilmente ácido), a la vez que un leve desplazamiento hipsocrómico. En presencia de reductores, las disoluciones de TT8 tampoco son muy estables, especialmente en medio ácido débil.

6.- El TT8 da positivos los ensayos generales de identificación de los barbitúricos: los ensayos de Zwikker y de P_arri no son muy sensibles (pD: 3,5 y 2,1 respectivamente); el producto de condensación con xantidrol tiene un punto de fusión de $251 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.- Realizamos un estudio y puesta a punto de la determinación volumétrica en medio acuoso-orgánico y en medio no acuoso. Hemos llevado a cabo la determinación en medio acuoso-orgánico, potenciométricamente, utilizando solución acuosa de hidróxido sódico; la confirmación del punto final se ha realizado por los métodos de la primera y la segunda derivadas. A partir de los datos experimentales de cinco muestras, se infiere:

Desviación estándar: 1,088

% Error: 5,4

% Recuperación: 104,2

de donde deducimos que los resultados son bastante acep-

tables, máxime si tenemos en cuenta la limitación por la escasa solubilidad del TTB en agua, lo que nos obligó a utilizar una disolución en agua-DMF 1:3.

- 8.- Se ha llevado a cabo la determinación volumétrica del TTB en medio no acuoso (DMF), utilizando como reactivo valorante estandarizado hidróxido de tetrabutilamonio, y como indicador, azul timol. A partir de los datos experimentales de once muestras se infiere:

Desviación estándar: 4,2807

% Error: 1,2

% Recuperación: 97,3

de donde deducimos que los resultados son bastante satisfactorios.

- 9.- Para la determinación fotométrica del TTB elegimos el máximo de absorción a 412 nm, por encontrarse en la zona del visible y por ser el que posee mayor absorptividad. Realizamos un estudio de las variables para poner a punto el método fotométrico (estabilidad, pH óptimo, influencia de la fuerza iónica). Fijadas las condiciones óptimas, se recomienda un procedimiento para la determinación fotométrica del TTB. Se lleva a cabo un análisis estadístico de los datos de la recta de calibrado. La Ley de Lambert-Beer se cumple entre 1 y 4 ppm de TTB. La absorptividad molar presenta un valor notable,

$$\epsilon_{412} = 4,2 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

10.- Se ha llevado a cabo un estudio sobre la precisión y seguridad del método fotométrico propuesto. Se obtienen los siguientes datos:

Rango (R): 0,027

Varianza (V): $4,53 \cdot 10^{-5}$

Desviación estándar de una medida (S): $\pm 6,73 \cdot 10^{-3}$

Desviación estándar de la media (S_m): $\pm 2,03 \cdot 10^{-3}$

Coefficiente de variación (C.V.): 1,6%

Error fotométrico: $\pm 1,07\%$

La seguridad del método fotométrico se deduce de la zona de mínimo error conseguida a partir del gráfico de Ringbom, y está comprendida entre $6 \cdot 10^{-6}$ y $1,2 \cdot 10^{-5}$ moles/l (1,4 y 2,8 ppm).

11.- Se estudian las condiciones óptimas de extracción (pH, fuerza iónica) en los dos disolventes más comúnmente usados, cloroforma y éter. Se representan las isotermas de partición y se calculan las razones de distribución, que resultan ser de 4,5 para la extracción con éter y de 9,9 para la extracción con cloroforma.

12.- Se determina el factor de recuperación de la extracción. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Extracción simple con éter

% Error de la media: 4,08

% Recuperación: 82,0

Extracción simple con cloroforma

% Error de la media: 2,40

% Recuperación: 91,7

Extracción doble con éter

% Error de la media: 2,27

% Recuperación: 85,1

Extracción doble con cloroformo

% Error de la media: 1,89

% Recuperación: 97,2

En el caso de la extracción simple se aprecia una recuperación mayor para la extracción con cloroformo, aunque no llega a ser cuantitativa. Con la extracción doble se observa un incremento apreciable en el porcentaje de recuperación, sobre todo para la extracción con cloroformo, que puede considerarse cuantitativa.

Por último, la extracción triple con cloroformo depara una recuperación completa:

% Error de la media: 1,55

% Recuperación: 99,8

DISOLUCIONES Y APARATOS

EMPLEADOS

DISOLUCIONES Y REACTIVOS

- Acido 2-tiobarbitúrico (SIGMA chemical co., USA)
- Tiofen-2-aldehido (EGA-CHEMIE)
- Disoluciones en acetona de TTB, de concentraciones $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.
- Disoluciones en DMF de TTB, de concentraciones $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; 0,75%; 2,0%; 2,5%.
- Solución reguladora ácido acético - acetato sódico de pH 4,75
- Solución reguladora ácido acético - acetato sódico de pH 5,0
- Solución reguladora de fosfatos de pH 6,8
- Soluciones reguladoras de zona alcalina, preparadas mezclando cantidades apropiadas de ácido bórico, cloruro potásico e hidróxido sódico (pH 8,6; 9,0; 10,1; 10,5; 11,1; 11,7; 12,1 y 12,7).
- Los demás reactivos y disoluciones utilizados en este trabajo (ácidos, bases, disolventes orgánicos, oxidantes, reductores, piperidina, xantidrol, etc.) son de pureza analítica R.A.

APARATOS

- Balanza analítica de precisión Metter tipo H6 dig Cap 160 g.

- Espectrofotómetro de I.R. Perkin-Elmer 621, con red de difracción (Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla).
- Espectrofotómetros Unicam SP-8000 y SP-800 de registro automático, con cubetas de cuarzo y de vidrio de 1,0 cm de paso de luz. Zonas U.V. y visible.
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer Coleman 55 digital, con cubetas de cuarzo y de vidrio de 1,0 cm de paso de luz. Zonas U.V. y visible.
- Espectrofotómetro Spectronic 70, Bausch and Lomb, con accesorio digital, provisto de cubetas de vidrio de 1,0 cm de paso de luz. Zona visible.
- Medidor de pH Philips PW 9408, digital, con electrodo combinado de vidrio-calomelanos.
- Medidor de pH Crison Digit 501, con electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl.
- Medidor de pH Radiometer P-28, con electrodo combinado de vidrio-calomelanos.
- Microscopio con platina de Kofler, calentada eléctricamente, para la determinación de puntos de fusión.
- Placa calefactora con agitador magnético incorporado Selecta Agimatic 243.
- Estufa Kowell tipo OLY.
- Centrífuga Emas de 5000 r.p.m.

BIBLIOGRAFIA

- (1) F.J. van Leent, Pharm. Weekblad, 73, 873-898 (1936)
- (2) M.K. Carter y M. Kathleen, J. Chem. Educ., 28, 524 (1951)
- (3) R.T. Harris, "Drug Dependence Advances in Mental Science", Univ. of Texas Press, Austin, 1970
- (4) A. del Pozo, "Farmacia Galénica Especial", 2ª ed., Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 1977
- (5) L.J. Casarett y J. Doull, "Toxicology: The Basic Science of Poisons", Macmillan Pu. Co., Inc., N. Y., 1975
- (6) M. Litter, "Farmacología", 6ª ed., Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1980
- (7) M. Dezelic, K. Dursun y M. Hadzimusic, Bull. Soc. Chem. and Technol., Sarajevo (Yugoslavia), 15, 23, (1966)
- (8) A.W. Dox y G.P. Plaisance, J. Am. Chem. Soc., 38 (1916)
- (9) Farmacopea Internacional (3ª ed.), volumen 1: "Métodos Generales de Análisis", O.M.S., Ginebra, 1980
- (10) H.F. Grutmacher y W. Arnold, Tetrahedron Lett., 22, 1365 (1966)
- (11) G.P. Hildebrand y C.N. Reilley, Anal. Chem., 29, 261 (1957)
- (12) C. Darglish, "Isolation and Identification of Drugs", E. G. C. Clarke (ed), The Pharmaceutical Press, London (1969)

- (13) L. Sommer, Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Purknianae, Brno, 5, 1964
- (14) D.A. Doornbos y R.A. Dezeew, Pharm. Weekbl., 104, 233 (1969)
- (15) J.J.L. Zwikker, Pharm. Weekbl., 68, 975 (1931)
- (16) W. Parri, Boll. Chim. Farm., 63, 401 (1924)
- (17) K. Bodendorf, Arch. Pharmaz., 270, 290 (1932)
- (18) G. Schwenker, Dtsch, Apoth-Ztg., 97, 312 (1957)
- (19) R. Fabre, J. Pharm. Chim., 26, 214 (1922)
- (20) K. Howorka y B. Howorka, Pharm. Prax., Berl. 11, 248 (1971)
- (21) T.L. Buxton y J.A. Caruso, Talanta, 20 (2), 254 (1973)
- (22) W.J. Dixon y F.J. Massey, "Introduction to Statistical Analysis", McGraw-Hill Book Co. 2ª ed., New York, 197 (1957)
- (23) M.J. Maurice, Z. Analyt. Chem., 204, 401 (1964)
- (24) A. Ringbom, Z. Anal. Chem., 115, 332 (1939)
- (25) I.M. Kolthoff, E.J. Meeham, E.B. Sandell y S. Bruckenstein, "Análisis Químico Cuantitativo", 4ª ed., Editorial Nigar S.R.L., Buenos Aires, 261 (1975)

INDICE

INDICE

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

CAPITULO I

SINTESIS Y CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DEL ACIDO 5-(2-TIOFEN) METILEN-2-TIOBARBITURICO

I.1. Síntesis	6
I.2. Solubilidad	8
I.3. Características espectrales	11
I.3.1. Espectro infrarrojo	11
I.3.2. Espectro de masas	11
I.3.3. Espectro ultravioleta-visible	16
I.4. Constante de ionización	24
I.5. Zonas de existencia de las diversas formas del TT8 en disolución	46
I.6. Estabilidad	53
I.6.1. Estabilidad a distintos pH	53
I.6.1.1. Estabilidad en medio ácido fuerte ...	53
I.6.1.2. Estabilidad en medio débilmente ácido	55
I.6.1.3. Estabilidad en medio neutro	55
I.6.1.4. Estabilidad en medio alcalino	55
I.6.2. Estabilidad térmica	58
I.6.3. Estabilidad frente a oxidantes	58
I.6.4. Estabilidad frente a reductores	64

CAPITULO II

ENSAYOS CUALITATIVOS PARA LA IDENTIFICACION DEL TT8

II.1. Ensayo de Zwikker	68
II.1.1. Cálculo de la sensibilidad del ensayo ..	69
II.2. Ensayo de Parri	70
II.2.1. Cálculo de la sensibilidad del ensayo .	71
II.3. Condensación con xantidrol	72

CAPITULO III

DETERMINACION VOLUMETRICA Y FOTOMETRICA DEL TT8

III.1. Volumetría ácido-base en medio acuoso	75
III.1.1. Preparación de NaOH 0,01 N	75
III.1.2. Estandarización de NaOH 0,01 N	76
III,1.3. Valoración de TT8	79
III.2. Volumetría ácido-base en medio no acuoso	79
III.2.1. Estandarización de hidróxido de tetrabutylamonio	79
III.2.2. Valoración del TT8 con DMF.....	86
III.3. Determinación fotométrica	88
III.3.1. Influencia del pH	88
III.3.2. Estabilidad con el tiempo	90
III.3.3. Influencia de la fuerza iónica	90
III.3.4. Procedimiento	92

III.3.5. Cumplimiento de la Ley de Lambert-Beer	94
III.3.5.1. Análisis de los datos de la recta de calibrado	97
III.3.6. Absortividad molar	104
III.3.7. Precisión del método fotométrico	106
III.3.7.1. Tendencia central	106
III.3.7.2. Dispersión	108
III. 3.8. Seguridad del método fotométrico ...	109

CAPITULO IV

EXTRACCION DEL TT8 CON DISOLVENTES

IV.1. pH óptimo de extracción	114
IV.2. Influencia de la fuerza iónica	115
IV.3. Isoterma de partición	120
IV.4. Factor de recuperación	128
IV.4.1. Extracción simple	128
IV.4.2. Extracción doble	129
IV.4.3. Extracción triple	134
Resumen y conclusiones finales	136
Disoluciones y aparatos empleados	143
Bibliografía	146