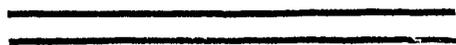


Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales ZARAGOZA



DESARROLLO DE UNA TECNICA COLORIMETRICA
PARA LA CUANTIFICACION DE TEVETOSIDOS
CARDIOTONICOS

T E S I S
QUE PRESENTA:
ALEJANDRO ALCANTARA PINEDA
PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO, D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA COLORIMÉTRICA PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE TETRAOSÍDOS
CARDIOTÓNICOS

INTRODUCCIÓN

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

ANTECEDENTES DE LA COLORIMETRÍA

ANTECEDENTES DE LAS TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS EN LA
CUANTIFICACIÓN DE CARDENÓLIDOS

ANTECEDENTES DEL SISTEMA EN REACCIÓN EN LA
CUANTIFICACIÓN DE CARDENÓLIDOS EN MEDIO BÁSICO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

MÉTODO Y MATERIAL

DESARROLLO

CONSIDERACIÓN PREVIA

DESARROLLO DEL TRABAJO

RESULTADOS

DISCUSIONES

CONCLUSIONES

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCION

Los tevetósidos cardiotónicos incluidos dentro del grupo de los cardenólidos, son glucósidos constituidos por una genina o aglucona en unión glucosídica con un monosacárido. La estructura básica de estos cardenólidos la constituye el ciclopentanoperhidrofenantreno sustituido en las posiciones 13 y 14 por metilo e hidroxilo respectivamente, y enlazado en el carbón 3 con el monosacárido tevetosa de aquí su nombre trivial, y en el carbón 17 con un butenólido o grupo carda (lactona alfa-beta insaturada) el cual le confiere su propiedad farmacológica.

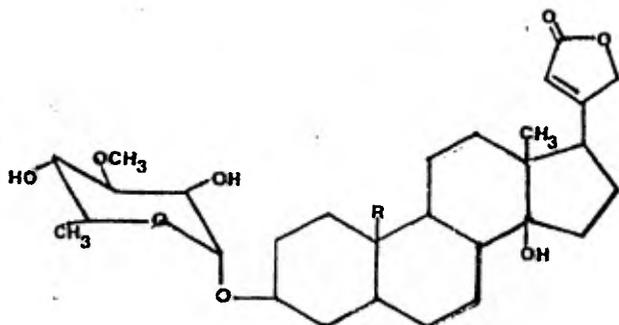


Figura 1. Estructura Básica de un Tevetósido Cardiotónico.

Los tevetósidos cardiotónicos se forman como productos de hidrólisis por la acción de enzimas endógenas a partir de glucósidos nativos presentes en la pulpa de las semillas del género Thevetia.

Los tevetósidos conocidos hasta la fecha son:

-La nerifolina (1) y cerberina o 2' monoacetilnerifolina (2), identificadas en T. nerifolia por Frerejacque en 1945.

-La peruvósida (3) aislada en T. peruviana (también denominada T. nerifolia) por Rangaswami y Venkata en 1958.

-La 2' monoacetilperuvósida (4) aislada de T. peruviana por Voigtlander y Balsam en 1969.

-La ruvósida (5) y persutina (6) también aisladas de la misma especie por Lang y Sun en 1964.

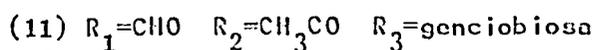
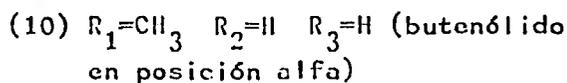
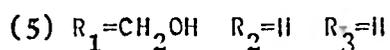
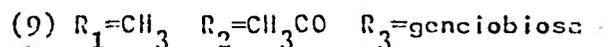
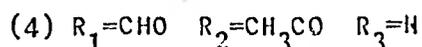
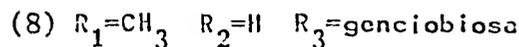
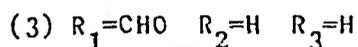
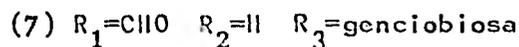
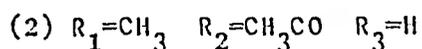
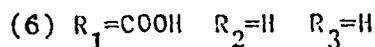
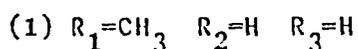
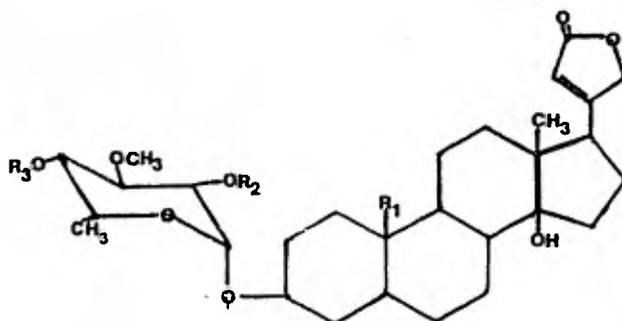
Mientras que por parte de los glucósidos nativos:

-La tevetina A (7) y la tevetina B (8) aisladas de T. neriifolia por Bloch y col. en 1960.

-La acetiltevetina B (9) aislada de T. peruviana por Voigtlander y Balsam en 1969.

-La tevefolina (10) aislada de la especie anterior por Frenejacque y Durgeat en 1971.

-La acetiltevetina A (11) identificada en T. nítida por Seelkopf en 1974.



En la República Mexicana existen 5 especies del género distribuidas en 22 estados: T. ahovai, T. cucinifolia o T. ovata, T. gaumeri, T. nerifolia o T. peruviana, T. plaumerifolia, y T. thevetoides; según las observaciones realizadas en los Herbarios del Instituto de Biología de la UNAM y de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN en 1980. Por lo que el país posee un gran potencial para la obtención de glucósidos carditónicos, a partir de recursos naturales renovables; que pueden ser utilizados como materia prima, ya sea para la obtención de medicamentos o para la síntesis de nuevos fármacos.

México en 1977 y 1978 importó mezcla de glucósidos carditónicos por un valor de 232 076.00 pesos y 184 736.00 pesos respectivamente. Debido a esto es necesario desarrollar una técnica analítica que permita realizar un estudio comparativo del contenido de glucósidos cardiotónicos en especies del género mencionado.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

La variación en la intensidad del color con la concentración de algún componente en un sistema líquido, es la base de la cuantificación de este mediante técnicas colorimétricas.

El componente colorido del sistema lo es por si mismo o generalmente a causa de una reacción química que tiene lugar al agregar un reactivo (o reactivos) apropiado(s) al sistema bajo ciertas condiciones. El componente colorido como cualquier molécula, tiene una energía interna que es la suma de la energía de translación al existir movimiento en la molécula, energía de vibración al existir movimiento de átomos respecto a los demás, energía de rotación al haber movimiento de la molécula alrededor de un eje, y energía electrónica al tener una configuración electrónica de la molécula.

Dado que la energía de la molécula puede adoptar solo ciertos valores discretos, es lógico que los niveles permitidos para la energía vibracional, rotacional, y electrónica estén íntimamente en relación con su estructura molecular. Si la molécula interacciona con una radiación electromagnética (energía propagada en forma de onda) de una frecuencia adecuada, de manera tal, que la energía de la molécula aumente; esta molécula ha efectuado una absorción de la radiación o sea una transición de un estado energético menor a uno mayor. Ya que la energía está cuantizada en los componentes de rotación, de vibración, y electrónico, la cantidad de energía absorbida por la molécula está limitada. Por esto la absorción de energía es función de la frecuencia de la radiación electromagnética y por ende con la longitud de onda de la misma.

La luz es una radiación electromagnética y una de sus características es la longitud de onda asociada a ella; un compuesto colorido en el cual siempre está presente un cromóforo (grupo con insaturaciones), la absorción de radiación es en gran parte debido a las transiciones electrónicas de la molécula, donde la luz visible es la que proporciona suficiente

energía suficiente para dar lugar a esas transiciones.

Como la cantidad de luz absorbida a una frecuencia dada se relaciona con el número de moléculas que absorben la radiación, se tiene lugar a procedimientos cuantitativos entre la concentración de la molécula y la energía absorbida por esta.

ANTECEDENTES DE LA COLORIMETRIA

Cuando un haz de luz a una longitud de onda permitida, incide en un medio homogéneo; dicha luz incidente (I_o) se refleja (I_r), se absorbe (I_a), o se transmite (I_t), es decir:

$$I_o = I_a + I_t + I_r \dots\dots(1)$$

Ya que en la práctica I_r se puede despreciar; (1) da:

$$I_o = I_a + I_t \dots\dots(2)$$

En 1760 Lambert investigó la relación entre I_o e I_t , o sea la relación entre un haz de luz incidente y un haz de luz transmitido, y posteriormente Beer en 1852 estudió la absorción de luz de soluciones con moléculas absorbentes, mas específicamente un compuesto colorido.

La ley de Lambert establece que cuando pasa un haz de luz monocromático por un medio transparente, la disminución de la intensidad del haz de luz con el espesor del medio es directamente proporcional a la intensidad de luz; por esto:

$$-(dI/dt) \propto I \dots\dots(3)$$

Donde: I = Intensidad de luz incidente de longitud de onda permitida
 t = Espesor del medio

Eliminando el signo de proporcionalidad:

$$-(dI/dt) = k_1 I \quad \dots\dots(4)$$

Separando variables y resolviendo la ecuacion diferencial entre los lmites indicados:

$$-(dI/I) = k_1 dt \quad \dots\dots(5)$$

$$\int_{I_0}^{I_t} dI/I = -k_1 \int_0^t dt \quad \dots\dots(6)$$

Da lugar:

$$\ln (I_t/I_0) = -k_1 t \quad \dots\dots(7)$$

Resolviendo para I_t :

$$I_t = I_0 e^{-k_1 t} \quad \dots\dots(8)$$

Donde: k_1 = Constante de proporcionalidad.

I_t = La intensidad de luz transmitida del medio absorbente.

I_0 = La intensidad de la luz incidente que llega al medio absorbente.

t = Espesor del medio.

Indicándonos la expresión anterior, que al aumentar aritméticamente el espesor del medio la intensidad de la luz transmitida decae exponencialmente.

Ya que: $\ln x = 2.3206 \log_{10} x$

Entonces (y) puede expresarse:

$$2.3206 \log_{10} (I_t/I_0) = -k_1 t \quad \dots\dots(9)$$

Resolviendo para I_t :

$$I_t = I_0 10^{-(k_1/2.3206)t} \quad \dots\dots(10)$$

Si $k_2 = k_1/2.3206$, (10) es:

$$I_t = I_0 10^{-k_2 t} \quad \dots\dots(11)$$

Donde k_2 se llama coeficiente de extinción, ya indicado por Bunsen y Roscoe en 1857; el cual se le define como la inversa del espesor (1 cm) requerido para reducir a un décimo la intensidad de la luz incidente.

O sea que matemáticamente $I_t = 0.1 I_0$, lo que al substituir en (11):

$$0.1 = I_0 10^{-k_2 t} \quad \dots\dots(12)$$

Y solo esto se cumple cuando $k_2 = 1/t$.

A la razón I_t/I_0 , que es la fracción de la luz incidente transmitida por un espesor t -del medio, se denomina transmisión o transmitancia, mientras que al inverso del logaritmo base 10 de la transmisión se llama absorción o absorbancia, a menudo denominada densidad óptica o extinción.

De lo anterior:

$$T = I_t/I_0 \quad \dots\dots(13) \quad \text{Donde:} \quad T = \text{Transmitancia}$$

Substituyendo (13) en (11):

$$T = 10^{-k_2 t} \quad \dots\dots(14)$$

Obteniendo \log_{10} de la expresión (14):

$$\log_{10} T = \log_{10} 10^{-k_2 t} \dots\dots(15)$$

Eliminando funciones inversas:

$$\log_{10} T = -k_2 t \dots\dots(16)$$

$$\log_{10} (1/T) = k_2 t \dots\dots(17)$$

Sabiendo que: $\log_{10} (1/T) = A \dots\dots(18)$

Donde: $A = \text{Absorbancia}$; al substituir (18) en (17)

$$A = k_2 t \dots\dots(19)$$

Lo cual indica que la absorbancia es una función lineal del espesor del medio absorbente.

En 1852, Beer estudió la influencia de la concentración de una molécula colorida sobre la transmisión y absorción de luz. Descubrió que existe la misma función entre la transmisión y el espesor del medio; es decir, la intensidad de un haz de luz monocromático disminuye exponencialmente con la concentración de la molécula absorbente:

$$I_t = I_0 e^{-k_3 c} \dots\dots(20)$$

En que: $k_3 = \text{Constante de proporcionalidad}$.

$c = \text{Concentración de la molécula absorbente}$.

Por lo que al combinar ambas funciones se puede plantear que la razón de cambio en la disminución de la intensidad de un haz de luz monocromático con el espesor del medio, es directamente proporcional a la intensidad de luz y a la concentración de la molécula absorbente;

por lo tanto:

$$-(dl/dt) \propto lc \quad \dots\dots(21)$$

Eliminando el signo de proporcionalidad:

$$-(dl/dt) = k_4 lc \quad \dots\dots(22)$$

Separando variables:

$$-(dl/l) = k_4 c dt \quad \dots\dots(23)$$

Integrando entre los límites indicados:

$$\int_{l_0}^{l_t} dl/l = -k_4 c \int_0^t dt \quad \dots\dots(24)$$

Lo que da:

$$\ln (l_t/l_0) = -k_4 ct \quad \dots\dots(25)$$

Representando a (25) en logaritmo base 10:

$$\log_{10} (l_t/l_0) = -(k_4/2.3206)ct \quad \dots\dots(26)$$

Elevando a la base 10 ambos términos y eliminando funciones inversas:

$$l_t/l_0 = 10^{-(k_4/2.3206)ct} \quad \dots\dots(27)$$

$$\text{Si } \xi = k_4/2.3206 \quad \dots\dots(28)$$

Y al substituir (13) y (28) en (27):

$$T = 10^{-\epsilon ct} \quad \dots\dots(29)$$

En que: T = Transmitancia
 = Coeficiente de extinción
 c = Concentración de la molécula absorbente
 t = espesor del medio absorbente

De (21): $A = \log_{10} (1/T)$

Al resolver para T:

$$T = 10^{-A} \quad \dots\dots(30)$$

Substituyendo a (30) en (29):

$$10^{-A} = 10^{-\epsilon ct} \quad \dots\dots(31)$$

Resolviendo para A:

$$A = \epsilon ct \quad \dots\dots(32)$$

Siendo esta última expresión la Ley de Lambert-Beer, función fundamental de la colorimetría y en general de la espectrofotometría; la cual indica que la absorción por una molécula colorida de un haz de luz monocromático sigue una dependencia lineal con la concentración de esta y el espesor del medio. El coeficiente de extinción es la constante de proporcionalidad, que es independiente de la concentración, paso del haz de luz e intensidad de la luz, y dependiente de la temperatura, disolvente, estructura molecular, y longitud de onda del haz de luz. Las unidades de epsilon (ϵ) se determinan a partir de c y t; si t es dada en centímetros y c en gramos sobre litro, tiene unidades de litro sobre gramo-centímetro y se llama coeficiente de extinción específico, índice de absorbencia, o absortividad, representandose como $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$

$\frac{A}{l \text{ cm}}$. Si c se expresa en moles sobre litro tiene unidades de litros sobre gramo-centímetro y es el coeficiente de extinción molar o absorptividad molar y se representa como ϵ ó a .

ANTECEDENTES DE LAS TECNICAS COLORIMETRICAS EN LA CUANTIFICACION DE CARDENOLIDOS

La cuantificación colorimétrica de los tevetósidos cardiotónicos se puede basar en las reacciones coloridas de la genina, que Frerejacque y de Graeve en 1963 las clasifican en reacciones en medio ácido y en medio básico.

Reacciones Coloridas en Medio Acido.- Estas reacciones son específicas para el anillo esteroidal de la genina, siendo el principal reactivo el ácido sulfúrico, como en:

-La determinación cuantitativa de digitonina en semillas de D. purpurea con ácido sulfúrico concentrado realizada por Elnain-Wojtaszek y col. en 1975.

-La cuantificación de escilarinas en preparaciones y formas farmacéuticas mediante la reacción de Lieberman por Kurkela en 1958.

-La determinación de esciloglucósidos en plantas silvestres de U. maritima mediante la reacción de Lieberman-Burchard después de una separación por cromatografía en capa fina por Karawya y col. en 1973.

-Y la determinación de escilarina con una variante de la reacción anterior por Dequeker y Leuli en 1956, de la siguiente forma:

...a 2 ml de la disolución acética de escilarina agregar 3 ml de anhídrido acético, 5 ml de ácido sulfúrico al 16% en anhídrido acético, y después de 90 minutos determinar la absorbancia a 661-662 nanómetros.

Reacciones Coloridas en Medio Básico.- Estas son específicas para la lactona alfa-beta insaturada (grupo carda). debido a que el metileno activo en dicho medio forma complejos de Meisenheimer en presencia de un compuesto nitroaromático según las investigaciones de Kovar y col. publicadas en 1977. Entre los compuestos nitroaromáticos empleados

en las reacciones con cardenólidos con objeto de efectuar determinaciones colorimétricas en estudios de diversa índole, se tienen los siguientes:

- Acido pícrico
- Metadinitrobenceno
- Acido 3,5 dinitrobenzoico
- 1,3,5 Trinitrobenceno
- Acido 2,5 dinitrobenzoico
- Acido 3,5 dinitrobencensulfónico
- 2,4 Dinitrodifenilsulfona
- 2,4 Dinitro-4' metildifenilsulfona
- 2,2',4,4' Tetranitrobifenilo

Que a continuación se describen:

Reacción con Acido Pícrico.- Baljet en 1918 describió la reacción de glucósidos cardiotónicos con este, adicionando al material en fase sólida un volumen dado de una solución 1:1* de ácido pícrico al 5%* en etanol e hidróxido de sodio al 10%. Knudson y Dresbach en 1923 proponen usar una solución 95:5 de ácido pícrico al 1% e hidróxido de sodio al 10%, al cual se le denomina Reactivo Alcalino de Picrato, mismo que Bell y Krantz aplican en 1945, 1946, en una técnica cuantitativa para glucósidos digitálicos puros, mediante la absorbancia producida por estos en presencia del Reactivo y que posteriormente la Farmacopea de los Estados Unidos XIV la adopta para cuantificar digitoxina y ouabaína tanto en materia prima como en formas farmacéuticas.

* Todas las soluciones líquido-líquido son volumen a volumen, a menos que se indique otra cosa.

* Todas las disoluciones líquido-sólido son peso a volumen, a menos que se indique otra cosa.

Swoap en 1948 en un estudio comparativo entre el método biológico y el método químico; para determinar la potencia en 20 tinturas decoloradas y 37 lotes de preparaciones purificadas de glucósidos digitálicos, utilizó al Reactivo Alcalino de Picrato:

...a 5 ml de la disolución etanólica del glucósido digitálico, agregar 5 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, agitar, dejar reposar por espacio de 20 minutos y leer la absorbancia hasta antes de los 30 minutos a 525 nanómetros.

En ese mismo año Bell y Krantz indicaron que el uso de hidróxido de tetraetilamonio como alcalinizante en la reacción de Baljet mejora la sensibilidad de la técnica en un 100% respecto de la que usa hidróxido de sodio en la cuantificación de digitoxina. Por lo que sugieren usar como reactivos al ácido pícrico al 5% en metanol absoluto (a) e hidróxido de tetraetilamonio al 10% (b):

... a 2 ml de la solución metanólica de digitoxina (aproximadamente 20 mg%), adicionar 0.1 ml de (a), 2 ml de (b), agitar y determinar la absorbancia después de 10 minutos.

Dentro de la misma publicación concluyen que las lecturas de absorbancia se deben de efectuar a 525 nanómetros, 20 minutos después de adicionar a la disolución de digitoxina una disolución que contenga 1 g de ácido pícrico y 1 g de hidróxido de sodio en 100 ml de metanol al 50%. Ellos mismos en 1949 indicaron en base a un estudio cuantitativo para la digitoxina y digitoxigenina, que en las técnicas reportadas por por ellos mismos en 1945 y 1948 dichos cardenólidos tienen una respuesta molecular (coeficiente de extinción molar) idéntica para ambas técnicas colorimétricas.

Buffoni y Giotti en 1949 reportan que las curvas de estabilidad del mismo complejo para varios cardenólidos de diferentes geninas, presentan diferencias en la mayoría de ellas.

Kennedy en 1950 mencionó que el procedimiento efectuado por Bell y Krantz en 1949, en que utilizan como alcalinizante hidróxido de tetraetil

amonio puede ser utilizado para cuantificar otros glucósidos digitálicos; basandose en los estudios de estabilidad del complejo y obediencia a la ley de Lambert-Beer con digitoxina, digoxina, y lantósido C. El autor hace uso de un reactivo, que contiene 1 g de ácido pícrico en 50 ml de metanol, 20 ml de hidróxido de tetraetilamonio, y agua suficiente para 100 ml en el procedimiento siguiente:

... a 10 ml de la disolución metanólica del digitálico, adicionar 15 ml del reactivo anterior, agitar, reposar durante 30 minutos, y determinar la absorbancia a 495 nanómetros.

Concluyendo que a 495 nanómetros la sensibilidad de la técnica es mayor que a 525 nanómetros, y la respuesta molar no es la misma en los 3 digitálicos.

Newland en 1950 reporta la utilización del Reactivo Alcalino de Picrato para la cuantificación de geninas provenientes de hojas de digitálicos mediante previa hidrólisis ácida, determinando a 492 nanómetros la absorbancia de la solución 30 minutos después de la adición del reactivo.

Brindle y Rigby también en el mismo año, investigan la reacción de Daljet en tinturas digitálicas decoloradas dando la siguiente técnica:

... a 12.5 ml de la disolución del digitálico, agregar 12.5 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, agitar, y determinar la absorbancia a 525 nanómetros después de 1 hora. Donde el tiempo de lectura lo indican del estudio de la estabilidad del complejo.

Käern en 1952 cuantifica tanto la digitoxina como su genina con previa separación cromatográfica en columna de alumina:

... a 5 ml de la solución del cardenólido (5 mg% a 10 mg%), adicionar 5 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, agitar y medir la absorbancia a 492 nanómetros entre 15 y 30 minutos. Mencionando que el método propuesto puede aplicarse a la determinación de digitoxina en tabletas, pero no así en tinturas digitálicas.

En el mismo año Rowson examina la técnica usada por Bell y Krantz

en 1948, argumentando que la longitud de onda elegida por estos autores (525 nanómetros) no es la adecuada para realizar la determinación cuantitativa de digitoxina, ya que según el estudio sobre la absorción del complejo al espectro visible el máximo se localizó alrededor de los 495 nanómetros, además de que el Reactivo Alcalino de Picrato produce color con el etanol el cual interfiere con la cuantificación del glucósido digitálico; por lo que la cantidad de etanol tanto en el blanco como en la solución a determinar la absorbancia debe de ser la misma. El autor por lo tanto da la siguiente técnica:

... a 5 ml de disolución de digitoxina (2 mg% a 8 mg%) en etanol al 50%, adicionar 5 ml del Reactivo Alcalino de Picrato (recientemente preparado), agitar, reposar durante 20 minutos, y determinar la absorbancia a 495 nanómetros, respecto de un blanco constituido por 5 ml de etanol al 50%, y 5 ml del Reactivo tratado de forma semejante. Determinando el tiempo de lectura en base al estudio de estabilidad del complejo.

Eastland y col. en 1952 efectúan la evaluación química de soluciones de glucósidos digitálicos usando el Reactivo Alcalino de Picrato:

... a 5 ml de la disolución del glucósido digitálico en etanol al 70%, agregar 5 ml del Reactivo recientemente preparado, agitar, y determinar la absorbancia a 530 nanómetros después de 20 minutos.

En 1955 Sellés y Flóres, utilizando al Reactivo Alcalino de Picrato para cuantificar digitoxina; concluyen que la lectura de absorbancia debe de realizarse a los 30 minutos de adición del reactivo a 520 nanómetros .

En el mismo año la Farmacopea de los Estados Unidos XV reporta como método oficial para cuantificar digitoxina u ouabaina tanto en materia prima como en formas farmacéuticas (mediante previa extracción); la siguiente técnica:

... evaporar a sequedad un volumen equivalente a 200 mg de digitoxina con ayuda de una corriente de aire y un baño María, humedecer el residuo

con 0.5 ml de alcohol*, evaporar una vez más a sequedad, enfriar, adicionar 5 ml de alcohol, reposar por 15 minutos agitando ocasionalmente, agregar 3 ml de Reactivo Alcalino de Picrato, agitar, proteger de la luz, y después de 5 minutos determinar la absorbancia de la solución cada 2 minutos hasta obtener el valor máximo a 495 nanómetros, respecto de un blanco que contenga todo excepto digitoxina tratado de igual manera. En donde el Reactivo Alcalino de Picrato es preparado con 20 ml de ácido pícrico al 1%, 10 ml de hidróxido de sodio al 5%, y agua suficiente para 100 ml; siendo este estable por 2 días.

Fuchs y col. en 1958 cuantificaron los glucósidos más importantes en extractos del digital, no sin antes realizar una separación por cromatografía en papel; determinando la absorbancia de la solución problema a 498 nanómetros 20 minutos después de la adición del Reactivo Alcalino de Picrato.

En 1960 la Farmacopea de los Estados Unidos, da un método semejante al de su antecesora para la cuantificación de los cardenólidos indicados, excepto que la lectura de absorción del complejo se efectúa a los 16 minutos de reposo a $25 \pm 3^\circ \text{C}$.

La Farmacopea Británica de 1963 proporciona un método para cuantificar digitoxina en tabletas, previa separación por cromatografía en columna:

... a 5 ml de digitoxina (0.004%) en alcohol, adicionar 3 ml del Reactivo Alcalino de Picrato recientemente preparado, en un lugar cubierto de la luz, agitar, dejar reposar entre 22° y 28°C por 60 minutos, y medir la absorbancia a 495 nanómetros respecto de un blanco que contenga 5 ml de alcohol y 3 ml del reactivo tratado de manera semejante. En esta el Reactivo Alcalino de Picrato es el mismo que utiliza la Farmacopea de los Estados Unidos XV.

* Si no se indica otra cosa, el alcohol es etanol al 96%.

La Farmacopea Oficial de la República Italiana de 1965 menciona la siguiente técnica para cuantificar digitoxina:

... a 5 ml de la disolución etanólica de digitoxina (4 mg^{cc}), adicionar 3 ml de la solución alcalina de picrato sódico, agitar, dejar reposar en un lugar obscuro entre 22° y 28° C, y después de 16 minutos leer la absorbancia a 495 nanómetros frente a un blanco que contenga todo excepto digitoxina, sometido al mismo procedimiento. Donde la solución alcalina de picrato sódico es una combinación de 30 ml de disolución de ácido pícrico al 0.66%, 6 ml de disolución de hidróxido de sodio al 8%, y suficiente agua hasta 100 ml; indicando que debe de ser utilizado entre las 2 horas después de su preparación.

También reporta el uso de disolución de ácido pícrico al 3% (a), e hidróxido de sodio al 1% (b), para cuantificar ouabaina en preparaciones inyectables:

... a un volumen equivalente o cercano a 0.5 mg de ouabaina, si es necesario completar a 2 ml con agua; agregar 10 ml de alcohol, 5 ml de (a), 5 ml de (b), agitar, y determinar la absorbancia de la solución a 491 nanómetros entre los 5 y 10 minutos respecto de un blanco de 2 ml de agua sometidos al mismo proceso.

Ting y Lou en 1966, en base a los estudios sobre la cuantificación de glucósidos cardiotónicos en tinturas de Periploca sepium con una solución 9 : 1 de ácido pícrico al 1%, e hidróxido de sodio al 10%, reportan que el máximo de absorción de la solución resultante ocurre a 505 nanómetros, y el color es más intenso y más estable entre los 40 minutos y 80 minutos, pero la función absorbancia-concentración del glucósido no sigue estrictamente la Ley de Beer.

La Farmacopea Europea de 1969 indica la preparación del Reactivo Alcalino de Picrato de la manera siguiente: disolver 0.25 g de carbonato de litio junto con 0.5 g de ácido pícrico en 80 ml de agua caliente, enfriar, y llevar con agua a 100 ml; el que es utilizado para la cuantificación de digitoxina:

... a 5 ml de disolución de digitoxina (40 mg/ml) en etanol al 90% adicionar 3 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, agitar, dejar reposar por 30 minutos protegiendo de la luz, y medir la absorbancia a 495 nanómetros a $20^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, en referencia de 5 ml de etanol tratado de forma igual.

La Farmacopea Húngara de 1970, da la siguiente técnica cuantitativa para digitoxina:

... a 2 ml de disolución de digitoxina (10 mg% en metanol, agregar 8 ml de metanol, 10 ml de solución de picrato de sodio, agitar, reposar en un lugar oscuro por 30 minutos, y determinar la absorbancia de la solución contra una combinación de 10 ml de metanol y 10 ml de solución de picrato de sodio a 495 nanómetros. La solución de picrato de sodio se prepara al momento de usarse con 1 g de ácido pícrico en 50 ml de metanol, 5 ml de disolución de hidróxido de sodio al 10%, y agua hasta 100 ml.

Kazarinov y col. en 1971, determinan convalatoxina usando solución de picrato de sodio, la cual es preparada con 0.9 g de ácido pícrico, 5 ml de disolución de hidróxido de sodio al 10%, y aforo con agua a 100 ml, utilizandole en la siguiente técnica:

... a 2 ml de disolución metanólica de convalatoxina (20 mg%), agregar 3 ml de metanol, 5 ml de solución de picrato de sodio, y determinar la absorbancia 15 minutos después, con un filtro verde-azúl (longitud de onda máxima = 490 nanómetros).

La Farmacopea Helvética de 1971 usa una combinación de 7 ml de hidróxido de sodio al 7% con 93 ml de ácido pícrico al 1%, denominada solución alcalina de picrato, la que es preparada en el momento de su uso en la cuantificación de digitoxina:

... a 5 ml de disolución metanólica de digitoxina (5 mg%), adicionar 5 ml de solución alcalina de picrato, agitar, reposar por 25 minutos a $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$, y determinar la absorbancia de la solución a 490 nanómetros respecto de una solución con 5 ml de metanol y 5 ml de la solución alcalina

preparada al mismo tiempo que la solución a examinar.

Karawya y col. en 1973. reportan que la sensibilidad del Reactivo de Baljet, así como la estabilidad del complejo es influenciada por el contenido de hidróxido de sodio en el mismo, durante un estudio cuantitativo de oleandrina y adinocina en Nerium Oleander.

La Farmacopea Británica de 1973, sigue utilizando el mismo reactivo que menciona la Farmacopea de los Estados Unidos XV, para la cuantificación de digitoxina:

... en un lugar obscuro, a 5 ml de disolución alcohólica de digitoxina (4 mg%), adicionar 3 ml del reactivo recientemente preparado, agitar, reposar durante 6 minutos entre 22° y 28° C, y determinar la absorbancia de la solución resultante a 495 nanómetros, respecto de un blanco con 5 ml de alcohol y 3 ml del reactivo sometido al mismo procedimiento. Esta técnica es usada para cuantificar digitoxina en tabletas previa separación por cromatografía en columna.

Tanto la Farmacopea de los Estados Unidos XIX, XX, como la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 4a., dan la siguiente técnica para cuantificar digitoxina en materia prima y en forma farmacéutica (tabletas):

... evaporar a sequedad 5 ml de una disolución de digitoxina (40 mg/ml) en alcohol, con ayuda de un baño de agua y una corriente de aire, humedecer el residuo con 0.5 ml de alcohol, evaporar nuevamente a sequedad, enfriar, adicionar 5 ml de alcohol, reposar por 15 minutos a $25 \pm 3^\circ$ C agitando ocasionalmente. En un lugar protegido de la luz agregar 3 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, agitar, reposar durante 8 minutos a $25 \pm 3^\circ$ C, y determinar la absorbancia a 495 nanómetros en intervalos de 2 minutos hasta obtener el valor máximo, contra un blanco que contenga todo excepto digitoxina sometido al mismo proceso. Donde el Reactivo Alcalino de Picrato es una solución con 20 ml de disolución de ácido pícrico al 1%, 10 ml de disolución de hidróxido de sodio al 5%, y agua hasta 100 ml, siendo viable durante 2 días después de su preparación.

Machova y Sovova en 1979 determinaron el contenido total de cardenólidos en Coronilla varia utilizando una solución con 95 ml de disolución de ácido pícrico al 1% con 5 ml de disolución de hidróxido de sodio al 20%, incubando la solución problema con el reactivo a 70° C y pH de 11.9 por 30 minutos y determinando la absorbancia a 490 nanómetros.

Entre otras publicaciones en que utilizan al ácido pícrico con fines cuantitativos se encuentran:

-La modificación a la reacción original de Baljet con objeto de cuantificar glucósidos digitálicos y sus preparaciones por Abrams y Dunn en 1950.

-La determinación del contenido de glucósidos cardiacos en muestras de Digitalis purpurea provenientes de cultivos hidropónicos para evaluar el efecto de la estación anual, edad de la planta, y temperatura ambiental por Tsao y Youngken en 1952.

-La evaluación de digitálicos en D. purpurea con objeto de comparar tanto el método biológico como el método químico por Rowson y Dyer en 1952.

-La cuantificación de agluconas tanto libres como combinadas en hojas del digital, efectuada antes y después de la hidrólisis enzimática endógena para determinar el porcentaje de glucósidos primarios, secundarios, y agluconas por Tattje y Van Os en 1953.

-La evaluación de digitoxina en tabletas y muestras purificadas con el fin de comparar el método colorimétrico reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos XIV, respecto del método biológico (en pichones) reportado por la Farmacopea de los Estados Unidos XIII, por Braun y Lusky en 1954.

-La determinación del contenido de glucósidos cardiacos en extractos percolados de hojas secas de D. lutea y D. purpurea con el fin de comparar 2 métodos de secado por Cosgrove y Guth en 1954.

-La cuantificación de glucósidos carditónicos en preparaciones

farmacéuticas (ampulas, soluciones, y supositorios) por Kurkela en 1958.

-La determinación fotométrica de glucósidos cardiacos en extractos acuosos de Adonis vernalis sometidos a almacenamiento y calentamiento por Tarasova en 1962.

-La microdeterminación de k-estrofantina, g-estrofantina, y digitoxina por Brockelt en 1963.

-La determinación de lanatóside C en hojas de D. lanata por Boichinov y col. en 1964.

-La cuantificación de cardenólidos a partir de tinturas preparadas de 8 muestras de digitálicos para comparar 3 métodos de cuantificación por El-Keiy y col. en 1965.

-La cuantificación de k-estrofantina previa separación por cromatografía en capa fina por Corona y Raiten en 1965.

-La cuantificación de convalatoxina en tabletas por Zharkova y col. en 1967.

-La determinación de convalatoxina en hojas de C. transcaucasica, C. keiskeky, y C. majalis por Kazarinov y col. en 1969.

-El contenido de glucósidos carditónicos en hojas, flores, tallo, y cáscara del tallo en N. oleander por Karawya y col. en 1970.

-La estimación de convalatoxina en hojas de C. majalis, C. orientalis, C. transcaucasica, además de la estimación de digitoxina y gitoxina antes y después de hidrólisis enzimática en D. purpurea por Dzyuba y col. en 1972.

-La determinación de cardenólidos en D. purpurea y D. lanata por Kartnig y Dauhofer-Noehammer en 1972.

-La cuantificación de lanatóside C en preparaciones, no sin antes separar por cromatografía en capa fina por Karamalakova en 1974.

-La determinación de acovenósido A, acovenósido C, y ouabaina en diferentes órganos de A. spectabilis por Karawya y col. en 1974.

Reacción con Metadinitrobenceno.- Marthoud en 1935 y Raymond en 1938 y 1939, son los primeros en estudiar este compuesto en soluciones alcalinas fuertes. La Farmacopea de los Estados Unidos XIV y XV reportan una técnica cuantitativa para digoxina utilizando este compuesto, la que es usada por Canabäck en 1950 para estimar digitoxina y otros cardenólidos. Esta técnica presentaba problemas de reproducibilidad debido a la poca estabilidad del complejo formado, por lo que Rowson en 1952 propone seguir la absorbancia del complejo a 620 nanómetros registrando las lecturas en intervalos de 30 segundos para después realizar una extrapolación en papel semilogarítmico de la lectura de absorción cuando el tiempo es igual con cero, encontrando reproducibilidad en la cuantificación de una misma solución de digitoxina.

Tanto en la Farmacopea de los Estados Unidos XIV como la XV usan una disolución de metadinitrobenceno al 1% en alcohol recientemente preparada (a), y disolución de hidróxido de sodio 1 N diluida 1 a 5* (b):

... aforar a 50 ml una cantidad equivalente de 20 mg de digoxina con alcohol del 80%, a 10 ml de esta adicionar 4 ml de ácido acético glacial diluido 1 a 2, y aforar con alcohol del 80% a 100 ml, transferir 5 ml de esta solución a un tubo de un colorímetro, agregar 5 ml de (a), agitar, incubar entre 0° y 2° C, adicionar lentamente 2 ml de (b) anotando el tiempo de adición, y exactamente 5 minutos después leer la absorbancia de la solución a 620 nanómetros respecto de un blanco de 5 ml de alcohol tratado de igual manera.

Banes en 1954 indica que a 0° C bajo las condiciones anteriores que la máxima absorbancia se alcanza en menos de 5 minutos y el color desaparece rápidamente, a temperaturas mayores la destrucción del complejo se acelera, por lo que es difícil obtener reproducibilidad en la absor

*Las diluciones son volumen a volumen y si no se indica otra cosa, son en agua.

bancias de alícuotas de una misma solución tratadas de manera idéntica, por lo que el mismo autor en el mismo año y junto con Carol en 1953, en base a los estudios efectuados por Hassal y Lippman publicados en 1953 sobre la utilización de soluciones básicas débiles en la estabilidad de los complejos resultantes de varios cardenólidos con metadinitrobenceno, da una técnica cuantitativa para determinar digoxina en inyecciones y tabletas no sin antes extraer con cloroformo, utilizando el siguiente reactivo: disolver 1.6 g de metadinitrobenceno en 80 ml de alcohol caliente, agregar 1 ml de hidróxido de tetrametilamonio al 10% a la solución fría, y aforar a 100 ml con etanol. Este lo usa en la siguiente técnica:

... transferir 5 ml de una solución etanólica de digoxina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a un tubo de ensaye que contenga viruta de carburo de silicón, evaporar a baño María, enfriar en un desecador al vacío por 30 minutos, agregar 4 ml del reactivo recientemente preparado, reposar a temperatura ambiente por 15 minutos, y determinar la absorbancia a 615 nanómetros hasta obtener el valor máximo de lectura.

Y dan (Banes y Carol) una técnica cuantitativa para determinar digitoxina en tabletas previa separación por cromatografía de partición, utilizando los siguientes reactivos; metadinitrobenceno al 2% en etanol (a), e hidróxido de sodio al 1% en etanol del 90%:

... a 2ml de una disolución etanólica de digitoxina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), adicionar 1 ml de (a), 1 ml de (b), agitar, y determinar la absorbancia a 560 nanómetros en intervalos de 2 minutos hasta obtener el valor máximo de lectura respecto de un blanco de alcohol tratado de manera idéntica. En ambos casos el (los) autor(es) argumenta(n) reproducibilidad de la técnica.

A partir de estas publicaciones se generaliza el uso de soluciones básicas débiles con objeto de estabilizar al complejo del cardenólido con metadinitrobenceno. Como por ejemplo la técnica que reporta la Farmacopea de los Estados Unidos XVI en la cuantificación de digoxina con el reactivo siguiente; a 1 ml de hidróxido de tetraetilamonio al 10%, agregar 140 ml de alcohol dehidratado, titular una porción de esta solución

con ácido clorhídrico 0.01 N, ajustar a una concentración de 0.008 N de la base por dilución con alcohol dehidratado si es necesario, e inmediatamente antes de su uso, combinar 40 ml de esta solución con 60 ml de disolución al 5% de metadinitrobenceno en benceno. Este reactivo es usado en el proceso que sigue:

... disolver 25 mg de digoxina en 50 ml de alcohol caliente, enfriar y aforar a 100 ml con alcohol, agitar, diluir 10 ml de esta disolución a 100 ml con alcohol, transferir 5 ml de la solución anterior a un tubo de ensaye de fondo cónico, evaporar a baño María hasta sequedad con ayuda de una corriente de aire, enfriar el residuo en un desecador durante 15 minutos, adicionar 15 ml del reactivo, dejar reposar por 15 minutos a una temperatura que no exceda de los 30° C, y determinar la absorbancia de la solución a 620 nanómetros en intervalos de 1 minuto hasta obtener el máximo de lectura respecto de 5 ml del reactivo. Esta técnica también es usada en combinación con técnicas de separación para la estimación de digoxina en inyecciones y tabletas.

La técnica anterior ha sido usada como método oficial para la determinación de digoxina en formas farmacéuticas y en materia prima con modificaciones mínimas, como por ejemplo: el uso de hidróxido de tetraetilamonio al 25% peso a peso en lugar del 10% en la preparación del reactivo que indica la Farmacopea Oficial de la República Italiana de 1965, la cantidad del volumen de base que es de 4 ml en vez de 1 ml, también en la preparación del reactivo en la Farmacopea de los Estados Unidos XIX y XX.

Entre otros trabajos donde es utilizado el metadinitrobenceno se encuentra:

- La microtécnica cuantitativa para cardenólidos por Brockelt en 1963.
- La determinación cuantitativa de g-estrofantina en sangre, plasma, y músculo (lengua) por Reitnauer en 1980.

Reacción con Ácido 3,5 Dinitrobenzoico.- Kedde en 1947 fue el primero en usar el reactivo al 2% en etanol (a), usando como base hidróxido de sodio 1 N (b), para la estimación de tinturas decoloradas de digitálicos por el siguiente procedimiento:

... a 5 ml de la tintura digitálica diluida, agregar 5 ml de (a), 9 ml de etanol, 2 ml de (b), aforar a 25 ml con agua, agitar, dejar reposar durante 1 hora a 20° C, y determinar la absorbancia a 530 nanómetros respecto de una dilución de la tintura digitálica.

Rowson en 1952 indica que la elección del blanco que utilizó Kedde no es el adecuado debido a que el ácido 3,5 dinitrobenzoico en medio básico da color, el cual interfiere con la lectura. Por lo que el autor investiga la técnica:

... a un volumen de una disolución de digitoxina que contenga de 0.1 a 0.8 mg de etanol del 50%, agregar 2 ml de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% (en etanol del 50%), 9 ml de etanol, 1 ml de hidróxido de sodio 1 N, agitar, y seguir la absorbancia de la solución a 530 nanómetros, hasta 75 minutos, en referencia de una solución tratada de igual manera, conteniendo todo lo anterior excepto digitoxina.

El autor observó que la absorbancia se incrementaba en los primeros 6 minutos permaneciendo constante durante 12 minutos para después disminuir hasta el tiempo en que dura la experiencia. Experimentos posteriores del espectro de absorción indican que el máximo de absorción del complejo se encuentra alrededor de los 535 nanómetros.

Pratt en 1952 reportó un diseño de una técnica colorimétrica para estimar digitoxina en tabletas, mediante previa extracción con etanol, utilizando ácido 3,5 dinitrobenzoico al 1% en etanol (a), y como base hidróxido de benciltrimetilamonio al 40% (b):

... a 3 ml de una disolución etanólica de digitoxina (15 µg/ml), adicionar 15 ml de etanol del 47%, 2 ml de (a), 2 ml de (b), agitar, y determinar la absorbancia a 550 nanómetros hasta obtener el máximo de lectura respecto de un blanco que contenga todo excepto digitoxina.

Langejan y Pinxteren en 1953 determinan el contenido de agluconas en polvos de hojas de digitálicos mediante previos métodos de extracción usando los siguientes reactivos: disolución etanólica al 2% de ácido 3,5 dinitrobenzoico (a), y solución de hidróxido de sodio 1 N (b):

... a 5 ml de la solución del digitálico, agregar 5 ml de (a), 9 ml de etanol, enfriar a 15° C, agregar 2 ml de (b), aforar con agua a 25 ml, agitar, reposar en baño de agua de 20° C por 10 minutos, y determinar la absorbancia a 550 nanómetros.

Tattje en 1957 aplica los siguientes reactivos: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en etanol (a), e hidróxido de sodio 1.5 N (b), para cuantificar digitoxina:

... a 4 ml de la disolución etanólica de digitoxina, agregar 5 ml de (a), 1 ml de (b), agitar, y después de 4 minutos medir la absorbancia a 540 nanómetros entre 15° y 25° C.

Harkis y Rigby en 1958 aplican al residuo de glucósidos cardiotónicos aislados de una separación cromatográfica de D. purpurea estos reactivos, ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en etanol (a), e hidróxido de sodio 1 N (b):

... al residuo del glucósido, agregar 2 ml de agua destilada, 5 ml de etanol, 2 ml de (a), agitar, adicionar 1 ml de (b), filtrar la solución, y determinar la absorbancia a 535 nanómetros en intervalos de 1 minuto hasta obtener el máximo de lectura.

Jiracok y Ponert en 1966 determinan el contenido total de esteroides cardiotónicos en extractos acuosos metanólicos de hojas frescas de C. majalis haciendo uso del ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol (a), e hidróxido de sodio 2 N (b):

... a 10 ml del extracto acuoso metanólico, adicionar 0.5 ml de (a), 0.5 ml de (b), agitar, y leer la absorbancia después de 7 minutos a 540 nanómetros.

También en 1966 Ting y Lou, utilizaron un reactivo constituido de una combinación 1:1 de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en metanol, e hidróxido

de potasio 1 N, para evaluar el contenido de glucósidos cardiotónicos en tinturas decoloradas provenientes de diversas partes de D. sepium:

... a 5 ml de la tintura digitálica decolorada, adicionar 5 ml del reactivo recientemente preparado, agitar, y determinar la absorbancia a 530 nanómetros entre los 4 y 12 minutos.

Hausser y col. en 1968, efectúan la evaluación química de digitoxina en D. purpurea y D. lanata, utilizando ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2% en etanol (a), e hidróxido de sodio 2 N (b):

... adicionar a 6 ml de la solución problema en etanol, 8 ml más de etanol, 5 ml de (a), 2 ml de (b), agitar, dejar reposar a 20° C, y antes de 11 minutos medir la absorbancia de la solución a 530 nanómetros.

Entre otras publicaciones en que hacen uso del ácido 3,5 dinitrobenzoico se pueden mencionar:

-La cuantificación de geninas tanto libres como combinadas de digitálicos por Langejan en 1951.

-La determinación de la potencia de tinturas decoloradas provenientes de 16 muestras de D. purpurea por Rowson y Dyer en 1952.

-Un estudio sobre la hidrólisis enzimática endógena en hojas de D. purpurea por Rowson y Simic en 1956.

-La cuantificación de glucósidos primarios a partir de extractos clorofórmicos evaporados, aislados mediante previa separación por cromatografía en columna por Baht y col. en 1961.

-La cuantificación cromato-colorimétrica de glucósidos de D. purpurea por Balcar en 1961.

-La microdeterminación colorimétrica de cardenólidos por Brockelt en 1963.

-Un estudio extractivo de estrofantina y helvetocósido a partir de semillas de Erysium carniolicum por Kobar-Smid en 1966.

-La estabilidad de soluciones inyectables de k-estrofantina-beta por Lutomsky en 1965.

-La cuantificación de cardenólidos y sus metabolitos en material

biológico (sangre, orina, músculo, y bilis) por Pfordte y Foerster en 1970.

-El estudio comparativo del contenido de digitoxina en 9 especies del género Digitalis por Fuchs y col. en 1951.

-El análisis cuantitativo en extractos etanólicos en partes secas de A. distorta por Manna y col. en 1978.

Reacción con 1,3,5 Trinitrobenceno.- Kimura en 1951 utiliza al compuesto al 0.04% en metanol (a) junto con hidróxido de potasio 1 N (b), para cuantificar ya sea digitoxina, ouabaina o estrofantina:

... a 4 ml de la solución problema (concentración menor de 10 mg%) agregar 0.5 ml de (a), 0.5 ml de (b), agitar, reposar por 35 minutos y determinar la absorbancia a 550 nanómetros.

Reacción con Acido 2,5 Dinitrobenzoico.- Mesnard y Lafargue en 1953, hacen uso del reactivo al 1% en metanol (a), basificando el medio con hidróxido de sodio al 40% (b), para detectar digitoxina, digoxina, gitoxina, oleandrina, ouabaina o las respectivas geninas de la manera siguiente:

... a 4 ml de la solución metanólica del cardenólido, adicionar 1 ml de (a), 7 ml de agua, 2 ml de (b), y agitar...

La que Fursov en 1961 la utiliza para cuantificar erimisina, cimarina, y oleandrina en formas farmacéuticas midiendo la absorbancia de la solución resultante a 449 nanómetros.

Reacción con Acido 3,5 Dinitrobencensulfónico.- Akatsuka en 1958 empleó una disolución al 2% de la sal potásica (a) y como base hidróxido de potasio al 5% (b), para determinar cuantitativamente digitoxina, estrofantina, y ouabaina respectivamente:

... a 4 ml de la solución del cardiotónico (concentración menor de 10 mg%) agregar 0.5 ml de (a), 0.5 ml de (b), agitar, reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, y medir la absorbancia a 530 nanómetros.

Reacción con 2,4 Dinitrodifenilsulfona.- Tattje en 1958 propone la utilización del compuesto en la determinación de digitálicos en tincturas, debido a que las digitoflavonas presentes en estas dan lugar en medio básico a una alta absorbancia alrededor de los 500 nanómetros e interfieren al efectuar las lecturas de intensidad de color.

Según los estudios de concentración de 2,4 dinitrodifenilsulfona, concentración de hidróxido de sodio, variaciones en el blanco, estabilidad del reactivo, influencia de la temperatura, y contenido de agua, con soluciones etanólicas de digitoxina; Tattje determinó la concentración del compuesto nitroaromático en 0.075% en etanol (a), y la concentración de hidróxido de sodio en 1.5 N (b); para utilizarse en la determinación cuantitativa siguiente:

... al glucósido o aglucona disuelto(a) en 4 ml de etanol libre de aldehído, agregar 5 ml de (a), 1 ml de (b), agitar, y después de un tiempo determinar la absorbancia de la solución a 600 nanómetros respecto de un blanco preparado con todo excepto el cardenólido problema, tratado de manera semejante. En donde el tiempo de lectura (desarrollo de máxima absorbancia) depende del glucósido o genina a cuantificar en base a sus observaciones realizadas con digitoxina, gitoxina y sus respectivas geninas y anhidroderivados.

Genkina y Abubakirov en 1963 reportan la estimación de glucósidos cardiotónicos (estrofantindina, erimisina, erisimósido, cimarina, y k-estrofantina-beta) con 2,4 dinitrodifenilsulfona al 0.075% en alcohol (a), e hidróxido de sodio 1.5 N (b):

... disolver de 2.5 a 3.5 ml de glucósido cardiotónico en 50 ml de etanol libre de aldehído, a 1 ml de la solución anterior agregar 1.25 ml de (a), 0.5 ml de (b), agitar y determinar la absorbancia después de 5 minutos a 595 nanómetros respecto de un blanco de 2.5 ml de (a), 2 ml de alcohol, y 0.5 ml de (b) sujetos al mismo procedimiento.

Vlasenko en 1969, utilizó la cromatografía en papel para separar la estrofantina de los pigmentos de origen animal, para después cuantificarla con 2,4 dinitrodifenilsulfona en alcohol al 0.075% (a) e hidróxido de

sodio 1.5 N (b):

... a 2 ml de la solución de estrofantina, adicionar 2.5 ml de (a), 0.5 ml de (b), agitar, reposar durante 5 minutos y determinar cerca de los 600 nanómetros.

Entre otras publicaciones donde citan el uso de la 2,4 dinitrodifenil-sulfona con objeto de cuantificar cardenólidos se encuentra:

-La determinación cromato-colorimétrica de k-estrofantina-beta, apo biósido, y cimarina por Genkina en 1972.

-La cuantificación de digitoxina, digoxina, y lanatóside C en extractos de hígado de cadáveres por Vlasenko en 1977.

-La evaluación del efecto de irradiación al ultravioleta en abicina y celanida por Popov y col. en 1977 y en erimósido y olitorósido por Mavlyanova en 1978.

-La determinación de erimisina en preparaciones, ampulas, y material biológico (hígado, riñones, sangre, y orina) por Mikhno y Kramarenko en 1978.

-La detrmnación de olitorósido en tejidos y líquidos de cadáveres frescos (hígado, riñon, sangre, y orina) por Mikhno y Postrigar en 1979.

-La cauntificación de digoxina en orina por Vlasenko en 1980.

Reacción con 2,4 Dinitro-4' metildifenilsulfona.- Genkina y Abubakirov en 1963 detrmnan glucósidos cardiotónicos o agluconas del grupo de la estrofantina con este compuesto nitroaromatico al 0.06% en alcohol (a) e hidróxido de sodio 0.15 N (b):

... a 1 ml de la solución etanólica del glucósido o aglucona (5 a 7 mg%), agregar 1.25 ml de (a), 0.5 ml de (b), agitar, reposar por 5 minutos a 20° C y determinar la absorbancia a 595 nanómetros frente a su blanco respectivo.

Reacción con 2,2',4,4' Tetranitrobifenilo.- Rabitzsch y Tambor en 1967 mencionan que varios procedimientos colorimétricos usados para lo

cuantificación de cardenólidos presentan desventajas en su uso, por lo que proponen la utilización de este reactivo (anteriormente empleado en reacciones de identificación) al 0.5% en etanol (a) e hidróxido de sodio 0.1 N (b) en el procedimiento siguiente:

... a 4 ml de la solución del cardenólido (0.0125 a 6.25 mg%), agregar 4 ml de (a), 1 ml de (b), reposar en obscuridad total a 20° C durante 30 minutos y determinar la absorbancia a 620 nanómetros contra un blanco que contenga todo excepto el cardenólido sujeto al mismo procedimiento.

Posteriormente en 1969 Rabitzsch y col., combinan la técnica anterior ajustando un volumen final de 5 ml y variando únicamente la concentración de la base a 0.15 N, con cromatografía en capa fina o en papel para determinar digitoxina e indican que la exposición a la luz por parte de las soluciones de gitoxina y g-estrofantina después de la adición de los reactivos disminuye su coeficiente de absorción molar.

Genkina y Eidler en 1974 determinan las concentraciones óptimas del 2,2',4,4' tetranitrobifenilo y de la base (hidróxido de potasio) en 0.15% y 0.15 N respectivamente, en base a sus estudios realizados con glucósidos cardiotónicos del grupo de la estrofantina.

Entre otras publicaciones donde es utilizado este compuesto nitro aromático se encuentran:

-El reporte de un método y sus limitaciones para efectuar micro determinaciones cuantitativas de cardenólidos y sus metabolitos en material biológico por Pfordte y Foerster en 1970.

-La cuantificación previa extracción y separación de los cardenólidos k-estrofantina y cimarina por Genkina y col. en 1972.

-El reporte de un método espectrofotométrico para determinar digitoxina, digoxina, y lanatósido C en hígado de cadáveres por Vlasenko en 1977.

-La determinación cuantitativa de digoxina en orina por Vlasenko en 1980.

ANTECEDENTES DEL SISTEMA EN REACCION EN LA CUANTIFICACION
DE CARDENOLIDOS EN MEDIO BASICO

Los componentes del sistema de reacción expuestos anteriormente se les enlista del modo siguiente:

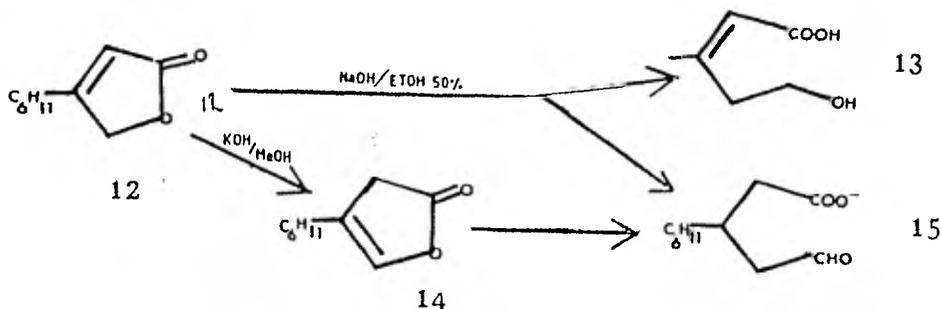
- Disolvente
- Base
- Cardenólido
- Compuesto nitroaromatico

Si se mantiene sin variar el disolvente las interacciones de importancia y que influyen en la formación del complejo colorido son:

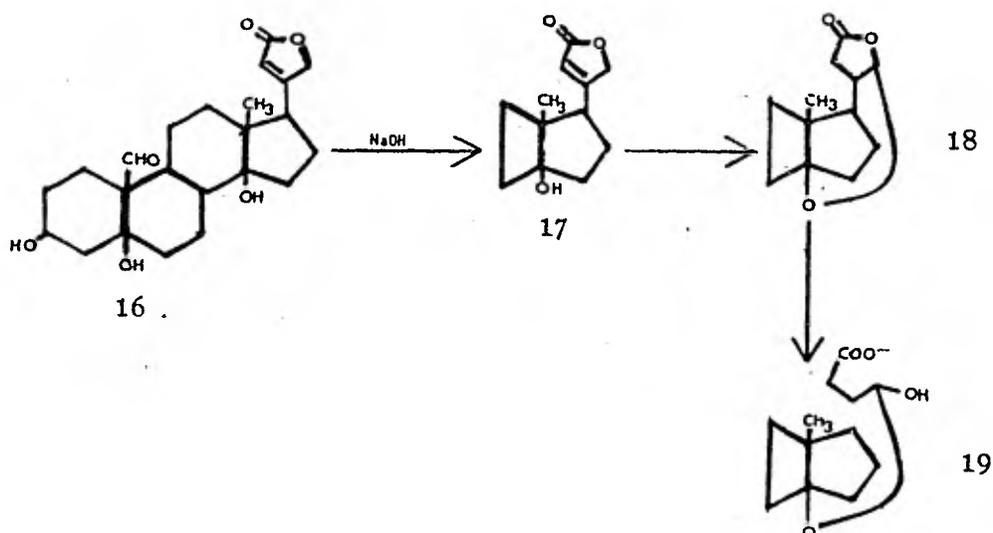
- a) Interacción Cardenólido-Base
- b) Interacción Cardenólido-Compuesto Nitroaromatico
- c) Interacción Compuesto Nitroaromatico-Base

Las que se describirán a continuación:

a) Interacción Cardenólido-Base.- La interacción de cardenólido con base conduce a productos de isomerización y de hidrólisis. En 1941 Paist y col. publican en base a la síntesis de un modelo constituido de una estructura alfa-beta insaturada, el beta ciclohexil $\Delta^{\alpha-\beta}$ -butenólido (12) el que es utilizado como un análogo de la estrofantindina, información acerca de su hidrólisis en medio básico, indicando que el análogo (12) al ser expuesto a una solución de hidróxido de sodio en etanol al 50%, sufre un proceso de hidrólisis para dar lugar al hidroxiácido insaturado (13) más el ácido aldehídico (15), el que también es formado por la acción de hidróxido de potasio en metanol absoluto. Postulan también que la transformación de (12) a (15) puede ser mediante la isomerización a la $\Delta^{\beta-\gamma}$ lactona e hidrólisis de esta.

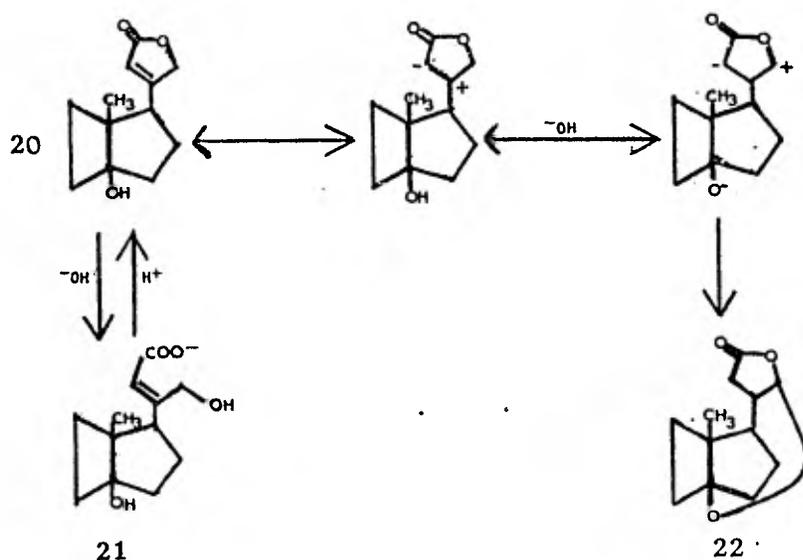


Además interpreta la transformación de la estrofantindina (16) a isoestrofantindina (18) por la migración del doble enlace a la posición beta-gama del butenólido (17), seguido de una adición intramolecular del hidroxilo del carbono catorce al doble enlace, ya anteriormente discutida por Jacobs y Collins en 1924, y Jacobs y Gustus en 1927 y 1928. Paist también indica que la isomerización es irreversible tratando la estrofantindina con solución metanólica de hidróxido de sodio por un corto periodo y la dilución de la solución alcalina con agua da lugar al lactol (19).

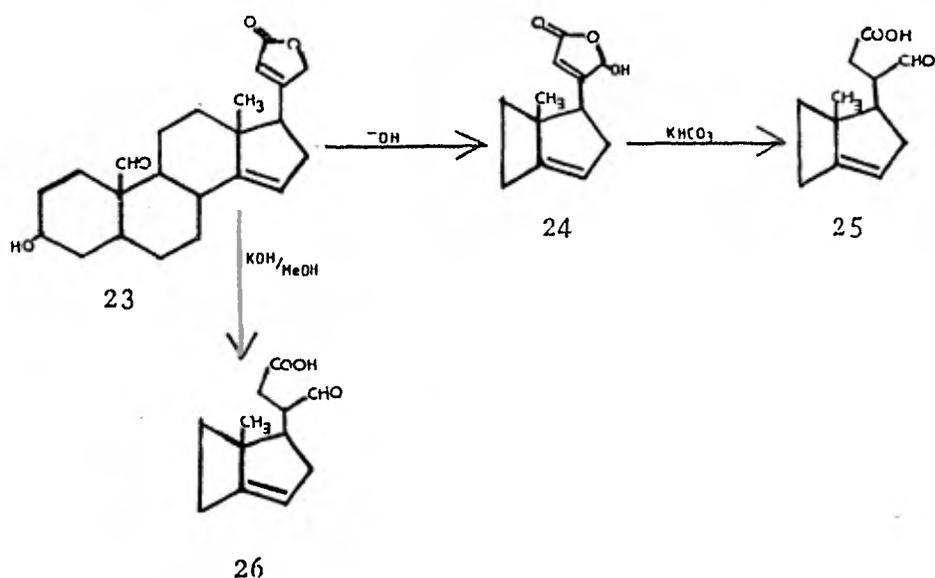


Demoen y Jansen en 1953 someten a reflujo una solución constituida de 5 mg de digitoxina, 30 ml de alcohol del 95%, 70 ml de agua, y 0.08 equivalentes de hidróxido de sodio, encontrando que la absorción a 220 nanómetros donde ocurre la absorción máxima de la molécula debido al sistema conjugado del butenólido, disminuye en un 100% después de 2 horas de reflujo; siendo este mismo fenómeno detectado para otros cardenólidos. Proponen que la disminución de la absorción a 220 nanómetros es el resultado de la formación de isocardenólidos (22), lo que fue indicado por Canabäck en 1950, y Langenjan en 1951.

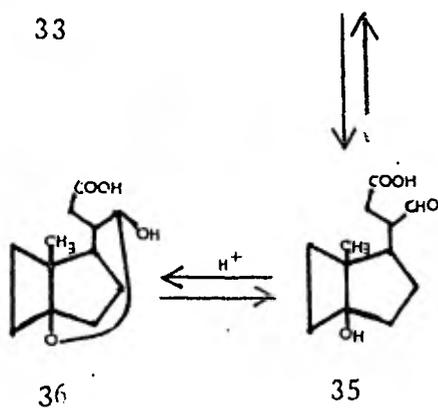
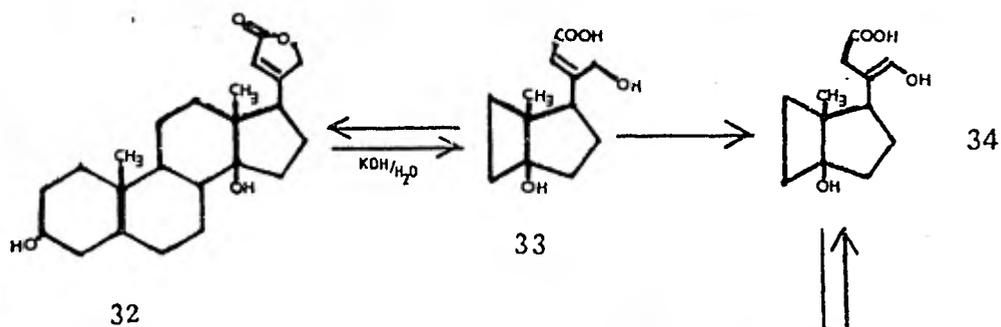
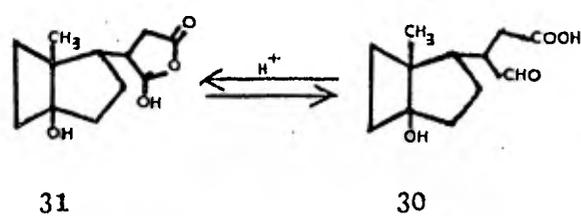
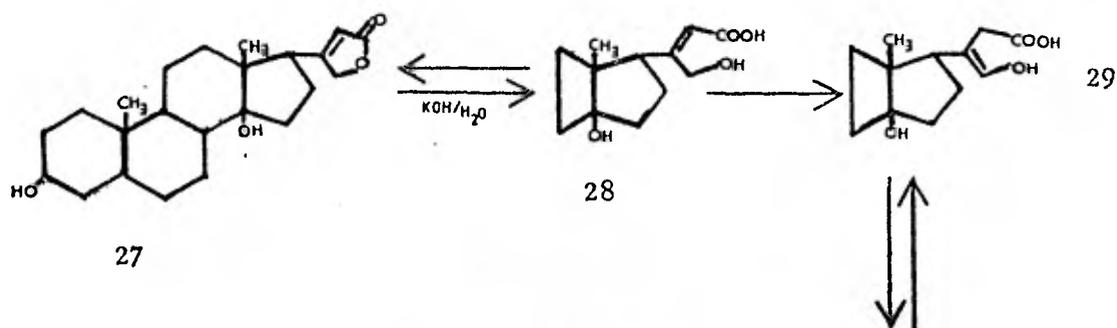
Ya que no existe una evidencia en contra de la migración del doble enlace $\Delta^{\alpha-\beta}$ a la posición $\Delta^{\beta-\gamma}$ del anillo butenólido y que Jacobs en 1929 indica que la velocidad de formación del epóxido entre el carbono catorce y la posición gama de la lactona es mayor que la hidrólisis del anillo (20 a 21) proponen el siguiente mecanismo:



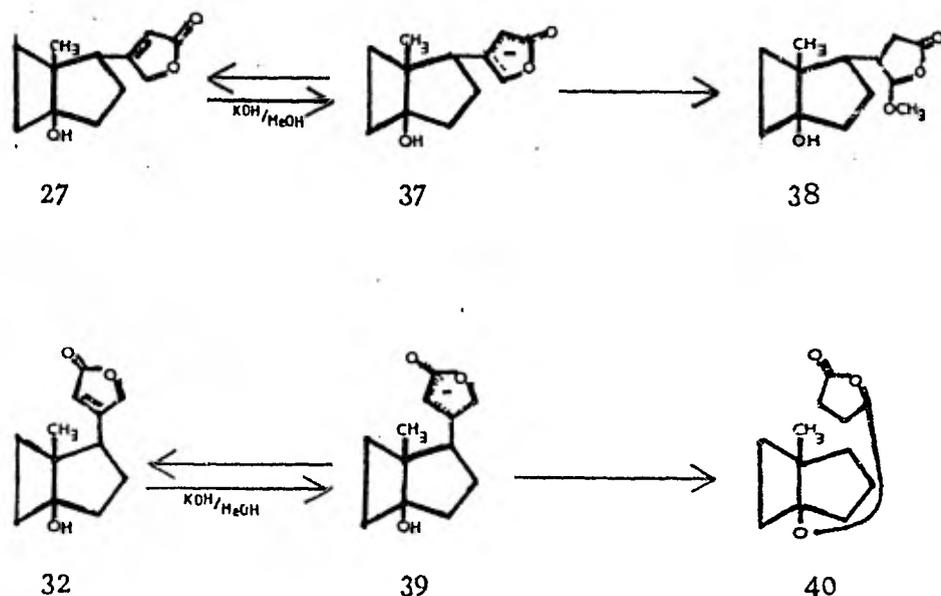
Makarichev y Abubakirov en 1968 reportan información sobre el mecanismo de reordenamiento de la defugenina o catorce anhidroestrog fantindina (23) en soluciones de hidróxido de potasio acuosa y metanólica respectivamente a temperatura ambiente. En hidróxido de potasio acuoso la defugenina es convertida a (24), que en solución de carbonato monoácido de potasio da lugar al ácido aldehídico (25); mientras que en potasa metanólica da lugar en primer término a un hidroxiaácido insaturado en una reacción reversible que después de un tiempo dado se vuelve irreversible, este hidroxiaácido insaturado es un derivado de alcohol vinílico el cual se isomeriza rápidamente al ácido aldehídico (26) que es el mismo que (25).



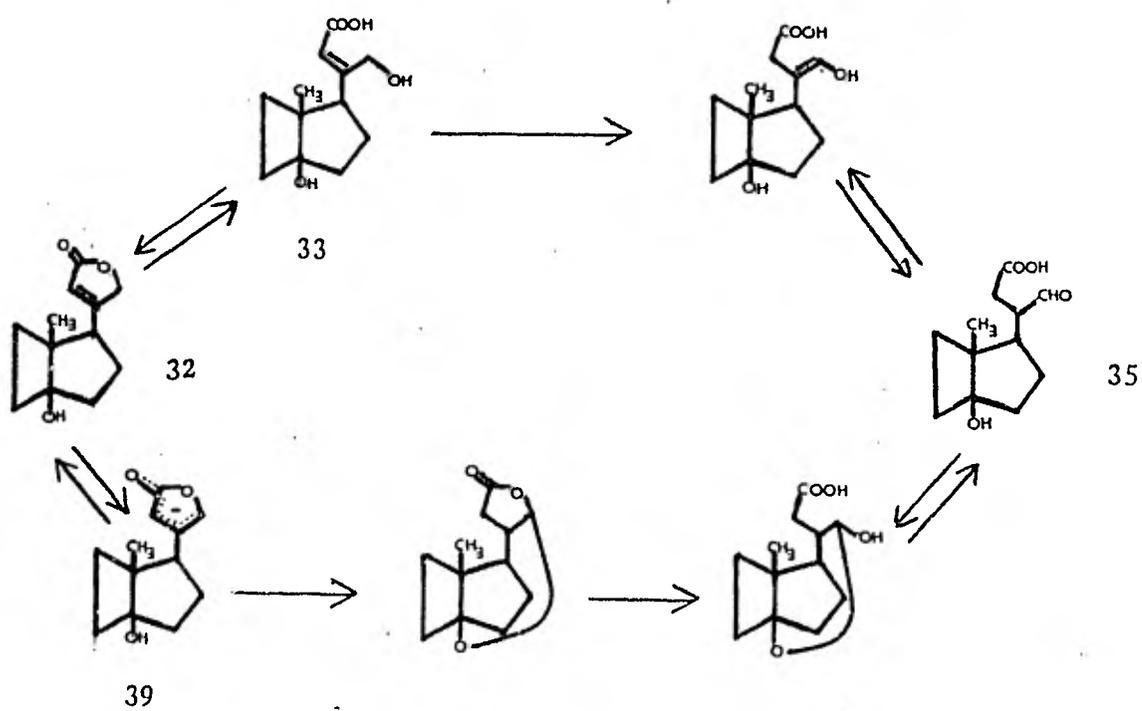
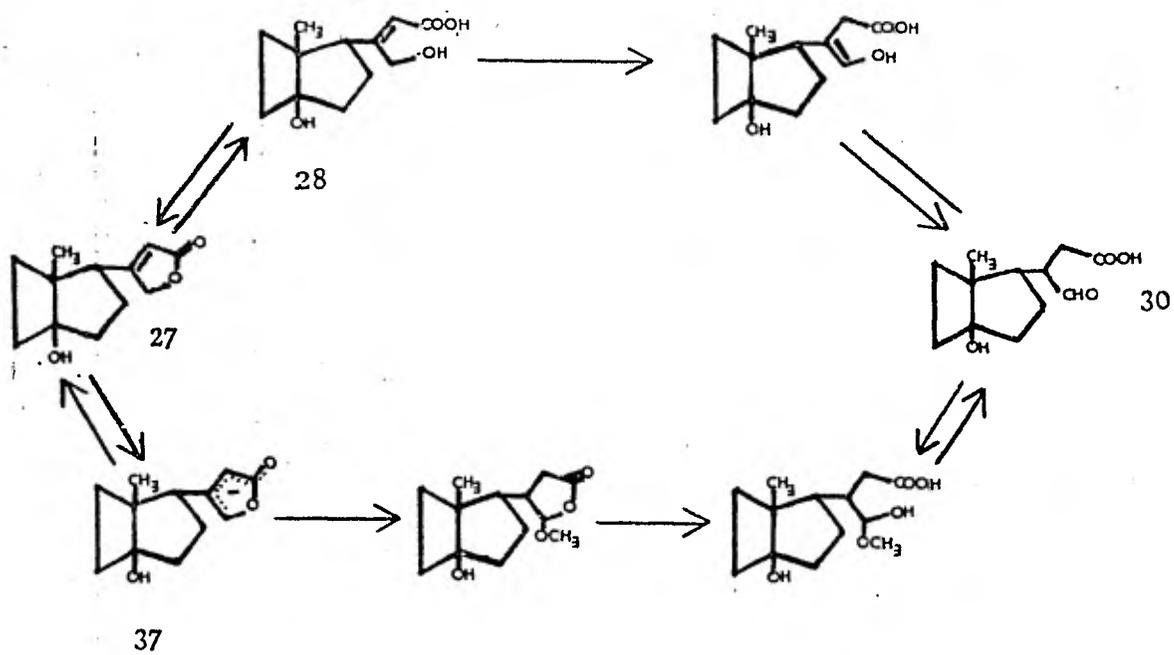
Lindig y Repke en 1972 publican información sobre el mecanismo de reacción de la catálisis básica de cardenólidos en función del solvente y la temperatura tomando como modelos a la diez y siete alfa digitoxigenina (27) y la diez y siete beta digitoxigenina (32). En el primer estudio (efectuado a 20° C) indican que el solvente utilizado es quien determina el curso de la reacción y la velocidad de isomerización. En hidróxido de potasio acuoso el ataque del radical hidróxido lleva a cabo la hidrólisis del anillo butenólido, para dar lugar al ácido gama hidroxycarbónico alfa-beta insaturado (28) y (33), donde el doble enlace emigra muy lentamente a la posición beta-gama dando por reordenamiento los aldenoles (29) y (34), que al isomerizarse dan lugar a los ácidos gama aldehidocarbónicos (30) y (35), los que se encuentran en equilibrio con el semiacetal ciclico al neutralizar el medio (31) y (36).



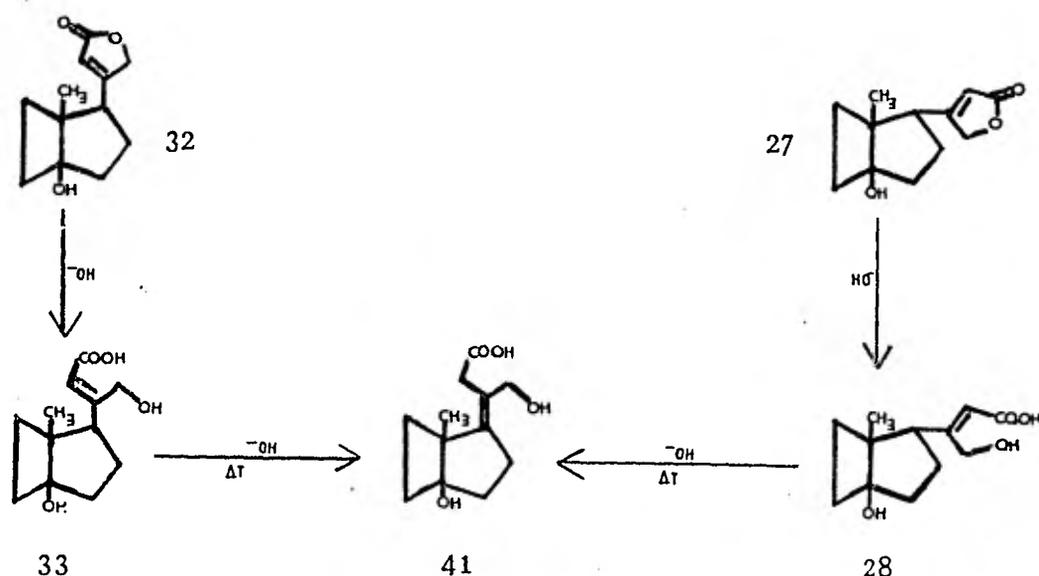
En potasa metanólica el ataque del ión más básico (metóxido) efectúa la formación de aniones furfílicos (37) y (39). Este paso es el que limita la velocidad de isomerización, la cual es acelerada por grupos hidroxilo adicionales en la posición doce-beta, diez y seis-alfa, o diez y seis-beta de (32). Adicionándose metanol a (37) se forma la metoxilactona (38), mientras que (39) por la adición intramolecular del catorce-beta hidroxilo a el anillo furfílico da lugar al catorce, veintiuno epoxicardenólido o isocardenólido (40)



En solución acuosa metanólica de potasa los productos de hidrólisis inicial de los cardenólidos (28) y (33), y los productos de isomerización, compiten para dar lugar a los ácidos gama aldehidocarbónicos (30) y (35).



En el segundo estudio indican que al calentar la diez y siete beta digitoxigenina (32) (digitoxigenina) o la diez y siete alfa digitoxigenina (27) con hidróxido de potasio acuoso 0.5 N a 20° C, se forma ácido Δ^{14-21} digitoxínico (41) el que es formado mediante el ácido Δ^{20-22} gama-hidróxi carbónico (28) o (33).



Interacción Cardenólido-Compuesto Nitroaromático.- La lactona alfa-beta insaturada de los cardenólidos es la parte de la molécula responsable de la formación del cromóforo resultante de la interacción cardenólido compuesto nitroaromático en medio básico. Ya en 1953 Mesnard y Lafargue, en 1963 Frerejacque y De Graeve, entre otros, indican que el doble enlace es necesario para que el color de la solución sea desarrollado. Fieser y Fieser en 1959, y Machova y Sovova en 1977, entre otros, mencionan que el metileno activo del anillo está involucrado en el cromóforo resultante.

La teoría de la formación del complejo publicada por Mulliken en 1952 indica que la formación del cromóforo entre el cardenólido y el compuesto

nitroaromático puede ser descrita como la combinación débil entre una base π (lactona alfa-beta insaturada) y un ácido π (compuesto nitro aromático). Kohasi y col. en 1970 y 1974, y Kovar en 1972 y 1974 publican reacciones de compuestos nitroaromáticos con compuestos que contienen metilenos activos, indicándose que esto da lugar a complejos sigma, conocidos como complejos de Meisenheimer (aniones estabilizados provenientes de la sustitución nucleofílica aromática); por lo que el mismo Kovar en 1972, y Kovar y col. en 1977, sugiere y establecen definitivamente que el cromóforo resultante de la interacción es un complejo de Meisenheimer, en base a un modelo de la digitoxina el metil deuterógeno (Figura 2), en el que se observa la participación del metileno activo en el complejo.

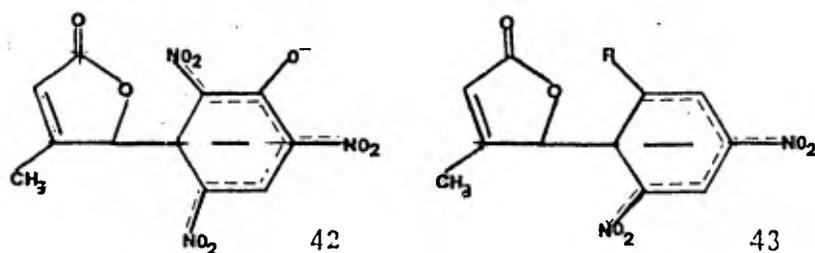
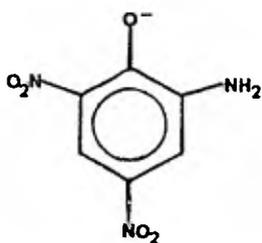


Figura 2. Complejos de Meisenheimer cardenólido-picrato (42), cardenólido 3,5 dinitrobenzoato (43) $R=CCO^-$, y cardenólido-metadinitrobenzoceno (43) $R=H$.

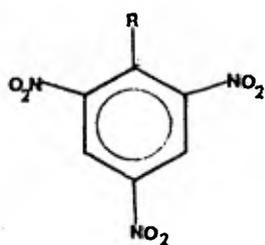
Otra teoría desarrollada fue la de oxidación-reducción sugerida por Newland en 1950, y Sivitskaya en 1961 en la interacción picrato-cardenólido. En esta la formación del cromóforo resultante es el picramato (44), producto de la reducción del picrato efectuada por un agente reductor, el cardenólido. Basándose en que el sulfito de sodio (agente reductor) desarrolla un color semejante al estar en contacto con el picrato bajo las mismas condiciones, por lo que Zakahrov y col. en 1967, y el mismo Sivitskaya en 1961, lo utilizan como sustituto del cardenólido al efectuar las curvas de calibración.



44

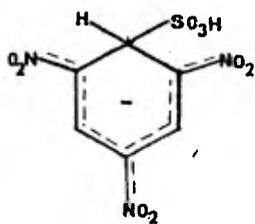
Polikarpov y col. en 1975 publican que la reacción de compuestos nitro aromáticos (derivados del trinitrobenzeno) (45) con sulfito de sodio da lugar a complejos de Meisenheimer (46), lo que desmintió la teoría de oxidación-reducción y apoyó en ese momento la aseveración de Kovar de 1972

Interacción Base-Compuesto Nitroaromático. - La interacción base-compuesto nitroaromático es el resultado del uso de una base en el medio de reacción, lo que da lugar a la formación de un nucleófilo causante de la interacción. En la mayoría de las técnicas expuestas, el medio de la reacción es una solución acuosa-alcohólica por lo que los nucleófilos formados son hidróxidos y/o alcóxidos capaces de interactuar con el compuesto nitroaromático respectivo.



R=Me, Et, Me₂CH, Me₃CH, H

45



46

De los compuestos nitro aromáticos usados en la cuantificación de cardenólidos, únicamente el uno, tres, cinco trinitrobenzeno, y el ácido pícrico han sido causa de investigación con los nucleófilos mencionados. El primero de ellos da lugar a los complejos de Meisenheimer con hidróxido, metóxido, o etóxido como reacción predominante (Figura 3); estudios acerca de las constantes de equilibrio, efecto de la luz en la reacción, concentración del nucleófilo, y espectro de absorción del complejo, son publicados por Gold y Rochester en 1964, para los nucleófilos etóxido y metóxido, valor de

tantes de equilibrio, efecto de la luz en la reacción, concentración del nucleófilo, y espectro de absorción del complejo, son publicados por Gold y Rochester en 1964, para los nucleófilos etóxido y metóxido, valor de

de la constante de equilibrio con el nucleófilo etóxido por Lambert y Schall en 1962, y datos de los parámetros cinéticos de las reacciones con los tres nucleófilos por Bernasconi en 1970 y Bernasconi y Bergstrom en 1971.

La reacción predominante de la interacción del ácido pícrico con hidróxido, metóxido, y etóxido, es la ionización del mismo para dar picrato (47), al que se le considera como un complejo aunque la aparición de un segundo complejo en el sistema de reacción se presenta a concentraciones altas de los nucleófilos. Estudios acerca de las constantes de equilibrio, efecto de la luz, concentración del nucleófilo, y espectro de absorción del complejo son publicados por Rochester y Gold en 1964.

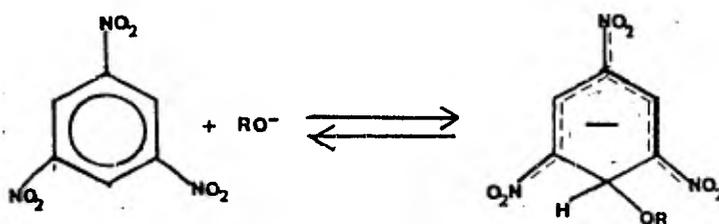
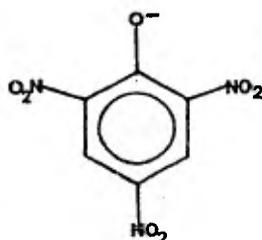


Figura 3. Reacción del 1,3,5-Trinitrobenzenceno con hidróxido (R=H), metóxido (R=CH₃), y etóxido (R=C₂H₅).



AUTOR	C.N.	C.C.N.	D.C.N.	ALC.	C.ALC.	D. ALC.	CAR.	D. CAR.	C.A.F.	L.O.	T.L.	ALC./CAR.	C.N./CAR.	ALC./C.N.
Swoap	ácido pícrico	0.95%	agua	NaOH	0.5%	agua	duabatna	etanol	48% de etanol	525	20-30	917.7	455.8	2.0
Bell y Krantz	idem	5%	metanol	hidróxido de tetraetilamónio	10%	agua	digitoxina	metanol	50% de metanol	525	10	2555.4	41.7	61.2
Bell y Krantz	idem	1%	metanol al 50%	NaOH	1%	metanol al 50%	digitoxina	metanol	75% de metanol	525	20	789.0	166.9	4.7
Kennedy	idem	1%	metanol al 50%	hidróxido de tetraetilamónio	2%	metanol	digitoxina ⁺ digoxina icnatósido C	metanol	70% de metanol	495 525	30	2643.7	1252.0	2.1
Brindle y Rigby	idem	0.95%	agua	NaOH	0.5%	agua	mezcla de cardenólidos	-	-	525	60	-	-	3.0
Bern	idem	0.95%	agua	NaOH	0.5%	agua	digitoxina	metanol	50% de metanol	492	15-30	638.7	317.2	2.0
Ranson	idem	0.95%	agua	NaOH	0.5%	agua	digitoxina	etanol al 50%	25% de etanol	495	20	798.4	396.5	2.0
Eastland y col.	idem	0.95%	agua	NaOH	0.5%	agua	digitoxina	etanol al 70%	35% de etanol	530	20	159.7	79.3	2.0
USP XV	idem	0.2%	agua	NaOH	0.5%	agua	digitoxina	etanol	60% de etanol	495	hasta obtener la máxima absorción	1333.7	100.2	13.3
USP XVI	idem	0.2%	agua	NaOH	0.5%	agua	digitoxina	etanol	60% de etanol	495	16	1133.7	100.2	13.5
Farmacopea Británica de 1963	idem	0.2%	agua	NaOH	0.5%	agua	digitoxina	etanol	60% de etanol	495	60	1133.7	100.2	13.5

Tabla I. Valor de las variables de las técnicas citadas en Antecedentes de las Técnicas Colorimétricas. C.N. = compuesto nitroaromático; C.C.N. = concentración del compuesto nitroaromático; D.C.N. = disolvente del compuesto nitroaromático; ALC. = alcali; C. ALC. = concentración del alcali; D. ALC. = disolvente del alcali; CAR. = cardenólido; D. CAR. = disolvente del cardenólido; C. A. F. = concentración alcohólica final, en la solución a determinar su absorción; L.O. = longitud de onda (nm); T.L. = tiempo en efectuar la lectura de absorción; ALC./CAR. = C.N./CAR.; y ALC./C.N. = razón de concentraciones alcali/cardenólido, compuesto nitroaromático/cardenólido, y alcali/compuesto nitroaromático en la solución final a determinar su absorción; a una concentración dada del cardenólido (+).

AUTOR	C.N.	C.C.N.	D.C.N.	ALC.	C.ALC.	D.ALC.	CAR.	D.CAR.	C.A.F.	L.O.	T.L.	ALC./CAR.	C.N./CAR.	ALC./C.N.	
Farmacopea Oficial de la República Italiana de 1965	Acido Pícrico	0.198%	agua	NaOH	0.48%	-	agua	digitoxina	metanol	60% de etanol	1495	16	1277.4	99.2	13.9
	idem	3%	agua	NaOH	1%	-	agua	ouabaina	agua	32% de etanol	491	5-10	695.7	765.5	0.9
Farmacopea Europea de 1969	idem	0.5%	agua	carbonato de litio	0.25%	-	agua	digitoxina	etanol	56% de etanol	495	30	132.3	250.4	0.5
Farmacopea Hungara de 1970	idem	1%	metanol al 50%	NaOH	0.5%	-	metanol al 50%	digitoxina	metanol	75% de metanol	495	30	344.0	166.9	1.8
Kazarinov y col.	idem	0.9%	agua	NaOH	0.5%	-	agua	convallatoxina	metanol	50% de metanol	490	15	589.8	270.4	2.2
Farmacopea Helvética de 1971	idem	0.93%	agua	NaOH	0.49%	-	agua	digitoxina	metanol	50% de metanol	490	25	1252.6	621.0	2.2
Farmacopea Británica de 1973	idem	0.2%	agua	NaOH	0.5%	-	agua	digitoxina	etanol	60% de etanol	495	6	1333.7	100.2	13.3
USP XIX USP XX FNEUM de 1974 ¹⁷	idem	0.2%	agua	NaOH	0.5%	-	agua	digitoxina	etanol	60% de etanol	495	hasta obtener la máxima absorción	1333.7	100.2	13.3
USP XIV USP XV	Metadinitro benceno	1%	etanol	NaOH	0.8%	-	agua	digoxina	etanol	70% de etanol	620	5	1561.4	1161.3	1.3
Banes	idem	1.6%	etanol	hidróxido de tetrametilamónio	0.1%	-	etanol	digoxina	etanol	95% de etanol	615	hasta obtener la máxima absorción	137.1	1189.2	0.1
Banes y Carol	idem	2%	etanol	hidróxido de tetrametilamónio	1%	-	etanol al 90%	digitoxina	etanol	94.5% de etanol	560	hasta obtener la máxima absorción	161.8	227.5	0.7
USP XVI USP XIX USP XX Farmacopea Oficial de la República Italiana de 1965	idem	3%	etanol al 38.4% en benceno	hidróxido de tetraetilamónio	3.2(10 ⁻³)M	-	etanol al 38.4% en benceno	digoxina	etanol al 38.4% en benceno	38.4% de etanol en benceno	620	hasta obtener la máxima absorción	100.0	557.4	0.2

Tabla 1. Continuación

AUTOR	C.N.	C.C.N.	D.C.N.	ALC.	C.ALC.	D.ALC.	CAR.	D.CAR.	C.A.F.	L.O.	T.L.	ALC./CAR.	C.N./CAR.	ALC./C.N.
Kedde	Acido 3,5 dinitrobenzoico	2%	etanol	NaOH	1 N	agua	digitálicos de <u>D. purpurea</u>	etanol acuoso	-	530	60	-	-	3.2
Rowson	idem	2%	etanol al 50%	NaOH	1 N	agua	digitoxina	etanol al 50%	74% de etanol	530	6	775.8	160.3	4.3
Pratt	idem	1%	etanol	hidróxido de benciltrimetilamonio	40%	agua	digitoxina	etanol	60% de etanol	550	hasta obtener la máxima absorción	87149.3	1602.7	54.4
Langejan y Pinxteren	idem	2%	etanol	NaOH	1 N	agua	agluconas de digitálicos	etanol	-	550	10	-	-	3.2
Tattje	idem	2%	etanol	NaOH	1.5 N	agua	digitoxina	etanol	86% de etanol	540	4	-	-	2.2
Harkis y Rigby	idem	2%	etanol	NaOH	1 N	agua	digitoxina	etanol	67% de etanol	535	hasta obtener la máxima absorción	2068.9	480.8	4.3
Jiracok y Ponert	idem	2%	metanol	KOH	2 N	agua	extractos de <u>C. majalis</u>	metanol acuoso	-	540	7	-	-	20.2
Ting y Lou	idem	1%	metanol al 50%	KOH	0.5 N	metanol al 50%	glucósidos cardíacos de <u>P. septum</u>	etanol acuoso	-	530	4-12	-	-	9.6
Hauser y col.	idem	2%	etanol	NaOH	2 N	agua	digitoxina	etanol	78% de etanol	595	5	-	-	7.5
Kimura	Trinitrobenzeno	0.04%	metanol	KOH	1 N	agua	digitoxina ⁺ ouabaina strofantina	-	-	550	35	1195.2	2.2	532.8
Fursou	Acido 2,5 dinitrobenzoico	1%	metanol	NaOH	40%	agua	erimisina cimarina oleandrina	metanol	33% de metanol	449	-	-	-	423.3
Akatsuka	Acido 3,5 dinitrobenzensulfónico	2%	agua	KOH	5%	agua	digitoxina ⁺ ouabaina estrofantina	metanol	-	530	10	852.2	60.8	14.0
Tattje	2,4 dinitrodifenilsulfona	2%	etanol	NaOH	1.5 N	agua	digitoxina ⁺ gitoxina gitoxigenina digitoxigenina anhidroderivados	etanol	86% de etanol	560	-	38.2	3.1	12.3

Tabla 1. Continuación

AUTOR	C.N.	C.C.N.	D.C.N.	ALC.	C.ALC.	D.ALC.	CAR.	D.CAR.	C.A.F.	L.O.	T.L.	ALC./CAR.	C.N./CAR.	ALC./C.N.
Genkina y Abubakirov	2,4 dinitrodi fenilsulfona	0.075%	etanol	KOH	1.5 N	agua	estrofantina erimisina erisimósido cimarina k-estrofantina-β	etanol	78.5% de etanol	595	5	4333.8	246.6	17.6
Vlasenko	idem	0.075%	etanol	KOH	1.5 N	agua	estrofantina	-	-	600	5	-	-	123.3
Genkina y Abubakirov	2,4,4' metidi fenilsulfona	0.06%	etanol	KOH	0.15 N	agua	grupo de la estrofantina	etanol	76.5% de etanol	595	5	4333.4	32.2	1.3
Rabitzch y Tambor	2,2',4,4' tetra nitrobifenilo	0.5%	etanol	NaOH	0.1 N	agua	digitoxina	etanol	85.3% de etanol	620	30	3059.7	183.1	16.7

Tabla 1. Continuación

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema a plantearse es el desarrollo de una técnica cuantitativa para tevetósidos cardiotónicos, mediante el uso de la colorimetría. Anteriormente se mencionó que la cuantificación de estos se puede efectuar por reacciones coloridas en solución de la genina o aglucona.

Las reacciones en medio básico son específicas para el anillo butenólido mientras que las reacciones en medio ácido lo son para el anillo esteroidal, por lo que el desarrollo de una técnica en medio básico dará lugar a una técnica más específica, ya que los tevetósidos cardiotónicos se diferencian en el radical R_1 del anillo esteroidal y no en la estructura butenólida, por esto nuestro planteamiento será enfocado a las reacciones coloridas en medio básico.

Ya se citaron varias técnicas en medio básico, en las que se pueden observar las siguientes variables:

- (a) Compuesto nitroaromático
- (b) Concentración del compuesto nitroaromático
- (c) Disolvente del compuesto nitroaromático
- (d) Base
- (e) Concentración de la base
- (f) Disolvente de la base
- (g) Cardenólido
- (h) Disolvente del cardenólido
- (i) Concentración a cuantificar del cardenólido
- (j) Alcohol
- (k) Concentración alcohólica en la solución final a medir su absorbancia
- (l) Longitud de onda a efectuar la lectura de absorbancia
- (m) Temperatura de incubación de la solución a determinarle la absorbancia
- (n) Tiempo en efectuar la lectura de absorbancia de la solución

Algunas de las cuales se pueden consultar en la Tabla 1, para las técnicas citadas en Reacciones Coloridas en Medio Básico, adicionando además la razón de concentraciones en la solución final a determinar la absorbancia, de álcali (base)/cardenólido, compuesto nitroaromático/cardenólido, y alcali (base)/compuesto nitroaromático, a una concentración dada de cardenólido.

Las variables se han dividido en independientes y dependientes, debido a que las variables dependientes:

- (i) Concentración a cuantificar del cardenólido
- (l) Longitud de onda a efectuar la lectura de absorbancia
- (n) Tiempo en efectuar la lectura de absorbancia de la solución

Son variables a caracterizar en el desarrollo colorimétrico, y obviamente, dependen de las variables independientes; es decir: el componente colorido en las técnicas expuestas es el producto de una reacción química al agregar un reactivo (o reactivos) al sistema de reacción bajo ciertas condiciones. Debido a que las transiciones electrónicas en el cromóforo están cuantizadas, debe de existir una estrecha relación de éstas con la estructura molecular y por consiguiente con su espectro de absorción por lo que la forma y el máximo de absorción del espectro dependen esencialmente de la estructura molecular del compuesto colorido, el que es formado al agregar un reactivo (o reactivos) en las técnicas en medio básico. Ya que una reacción química es un sistema dinámico, el compuesto colorido sigue una cinética química dentro de él, por lo que las variables que afecten la cinética química como lo son el pH, la temperatura, los disolventes, la concentración de reactivos, entre otras; da lugar a que tanto la sensibilidad como el tiempo en efectuar la lectura de absorbancia dependan de estas.

En un sistema reaccionante para la cuantificación de cardenólidos en medio básico se encuentran los siguientes compuestos: compuesto nitroaromático, base, cardenólido, disolvente (alcohol-agua); eligiéndose para desarrollar al trabajo experimental a:

-El ácido pícrico y ácido 3,5 dinitrobenzoico como compuestos nitroaromaticos, debido a su uso más frecuente en la cuantificación de digitoxina, glucósido cardiotónico cuya genina la digitoxigenina (32) es semejante a la genina de los tevetósidos cardiotónicos, además de que la estructura del cromóforo ha sido ya establecida para ambos con digitoxigenina y por lo tanto extrapolable con los tevetósidos cardiotónicos.

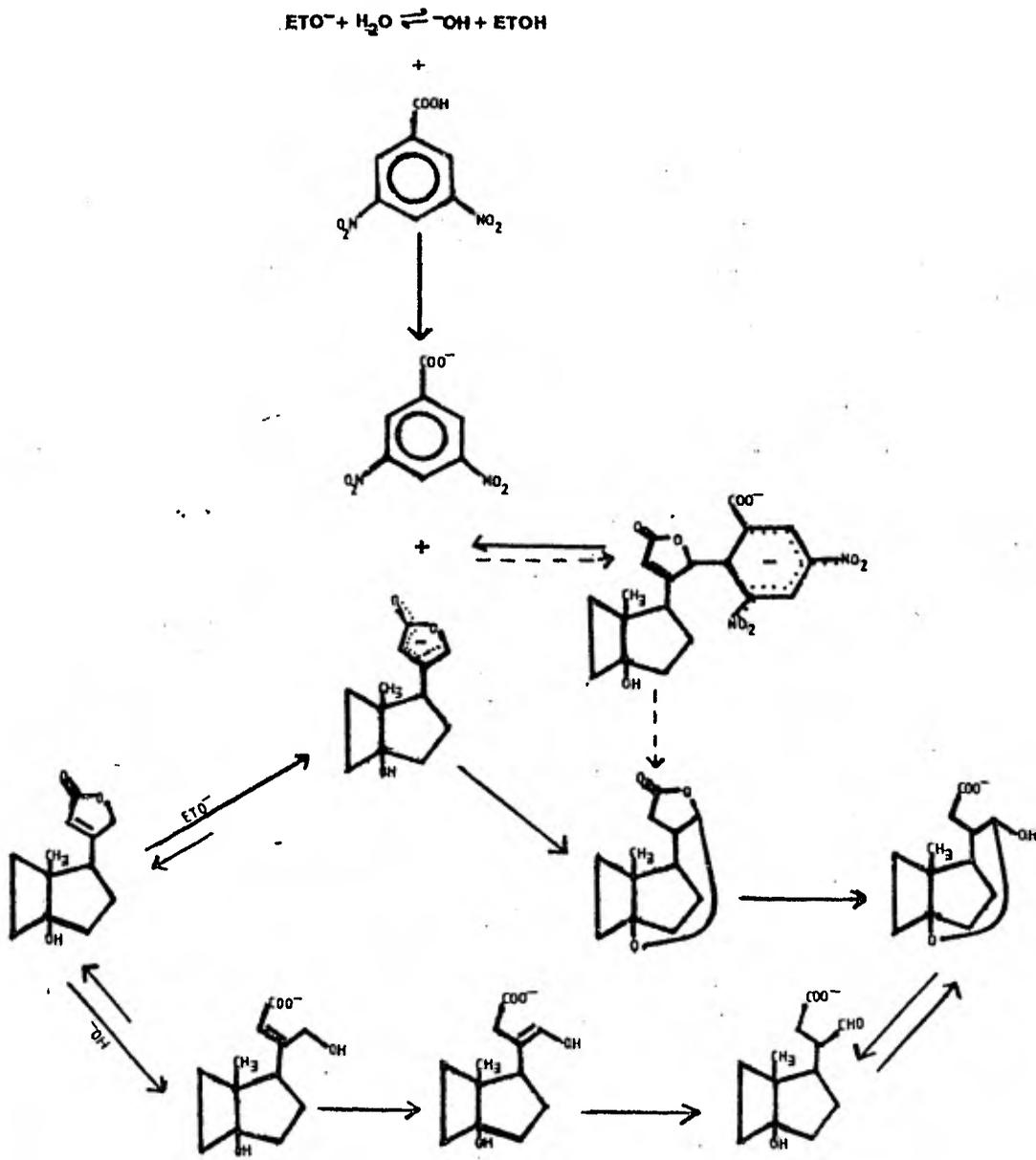
-El hidróxido de sodio como base, debido a la información reportada de la isomerización e hidrólisis en medio básico de la digitoxigenina, y a su uso más frecuente en la cuantificación de cardenólidos.

-La nerifolina como cardenólido, ya que la genina de este tevetósido es la digitoxigenina.

-Y como participante del sistema alcohol-agua (cosolvente), al etanol debido a su utilización más frecuente con ambos compuestos nitroaromaticos, y a la información reportada de las reacciones de alcóxidos con ácido pícrico.

Por lo que se pueden plantear el sistema reaccionante tanto con ácido pícrico, como con ácido 3,5 dinitrobenzoico:

Sistema Reaccionate Nerifolina-Dinitrobenzoato

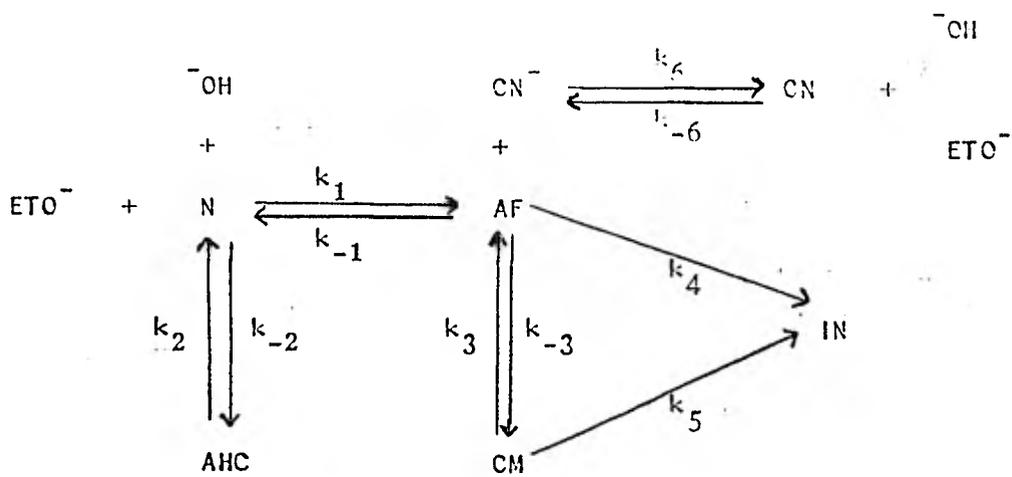


En los sistemas reaccionantes descritos, al basificar el medio acuoso-alcohólico se establece rápidamente un equilibrio entre el hidróxido y etóxido (Bernasconi y Bergstrom en 1971) el que está desplazado a la derecha en ambos sistemas reaccionantes, ambas bases al reaccionar con el compuesto nitroaromático da lugar a los aniones respectivos, y que en el caso del picrato, al reaccionar este con etóxidos o hidróxidos da lugar a un complejo (P) que interactúa con fotones (luz visible por ejemplo) para dar lugar a otros productos aún no identificados e iones nitrito (Rochester y Gold en 1964, Rowson en 1952).

La nerifolina en ambos sistemas reacciona con las dos bases, con el etóxido forma el anión furílico que al reaccionar con el ion picrato o ion dinitrobenzoato da como producto el complejo de Meisenheimer respectivo, proponiéndose la formación del complejo a partir del anión furílico debido a la influencia del alcohol en el coeficiente de absorción y en la estabilidad del mismo (Ababakirov y Genkina en 1960, Harkiss y Rigby en 1957). A partir del anión furílico se forma la isonerifolina, formándose posiblemente a partir del complejo, ya que este tiene una fase de destrucción (Pratt en 1952), la isonerifolina al hidrolizarse da lugar al semiacetal cíclico el que da lugar en su forma aldehídica al ácido gama aldehído carbónico.

La nerifolina se hidroliza en presencia de hidróxido al ácido gama hidroxycarbónico alfa-beta insaturado, en el que al emigrar muy lentamente el doble enlace forma el aldenol que al isomerizarse forma el ácido gama aldehídico carbónico capaz de transformarse al semiacetal cíclico.

Por lo que en base a lo anterior se propone el siguiente esquema cinético general:



En que:

- N= nerifolina
- AF= anión furfílico
- CM= complejo de Meisenheimer
- IN= isonerifolina
- CN= compuesto nitroaromático
- CN⁻= anión del compuesto nitroaromático
- AHC= ácido hidroxycarbónico
- OH⁻= ión hidróxido
- ETO⁻= ión etóxido
- k_i= constante de velocidad respectiva

Donde el modelo cinético del complejo de Meisenheimer es:

$$d(\text{CM})/dt = k_3(\text{AF})(\text{CN}^-) - (k_{-3} + k_5)(\text{CM}) \dots (40)$$

Y los modelos cinéticos para las demás moléculas que participan directamente o indirectamente en el modelo anterior son:

$$d(\text{AF})/dt = k_1(\text{OH}^-)(\text{N}) + k_{-3}(\text{CM}) - (k_{-1} + k_3(\text{CN}^-) + k_4)(\text{AF}) \dots (41)$$

$$d(\text{N})/dt = k_{-1}(\text{AF}) + k_{-2}(\text{AHC}) - (k_1(\text{ETO}^-) + k_2(\text{OH}^-))(\text{N}) \dots (42)$$

$$d(\text{AHC})/dt = k_2(\text{OH}^-)(\text{N}) - k_{-2}(\text{AHC}) \quad \dots\dots(43)$$

$$d(\text{CN}^-)/dt = k_6(\text{OH}^-) + k_6'(\text{ETO}^-) - k_{-6}(\text{CN}^-) \quad \dots\dots(44)$$

Siendo $d(\quad)/dt$ la razón de cambio de la concentración de la molécula respectiva en el tiempo, es decir la cinética química de esta en el sistema.

Al reportarse que:

-La velocidad de formación del isocardenólido es mayor que la hidrólisis del cardenólido (Jacobs en 1929, Demoen y Jansen en 1953).

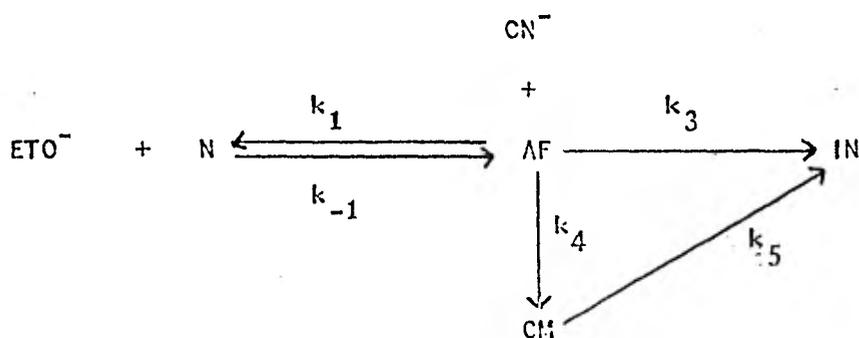
-La concentración de etóxido e hidróxido permanecen constantes en los sistemas, debido a que el equilibrio entre las bases se alcanza rápidamente.

Tomando en cuenta que:

-El equilibrio ácido-base se establece rápidamente.

-Las reacciones fotoquímicas en el sistema reaccionante de ácido pícnico se pueden evitar.

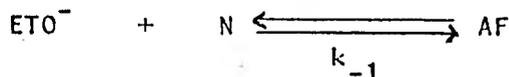
Y bajo la suposición que la reacción entre el anión furfílico y el complejo de Meisenheimer es irreversible. El esquema cinético se simplifica a:



Del cual pueden darse los 2 siguientes modelos cinéticos, para la concentración del complejo de Meisenheimer:

Modelo I

En la reacción



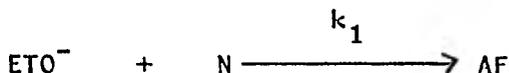
El equilibrio se alcanza rápidamente y por lo tanto:

$$(\text{CM}) = \frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-) (\text{ETO}^-) (N_0)}{k_{-1} (k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_5)} \left(e^{-k_5 t} - e^{-(k_3 (\text{CN}^-) + k_4) t} \right)$$

Pudiendose consultar la resolución de este modelo en el Anexo 1.

Modelo II

La reacción



Es irreversible y por esto:

$$(\text{CM}) = \frac{k_1 k_3 (\text{CN}^-) (\text{ETO}^-) (N_0)}{k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_1 (\text{ETO}^-)} \left(\frac{e^{-k_5 t} - e^{-k_1 (\text{ETO}^-) t}}{k_1 (\text{ETO}^-) - k_5} - \frac{e^{-k_5 t} - e^{-(k_3 (\text{CN}^-) + k_4) t}}{k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_5} \right)$$

Pudiendose consultar la resolución de este modelo en el Anexo 1.

Estos son modelos cinéticos mecanísticos propuestos, que predicen el cambio de concentración del complejo en el tiempo, y la influencia de la concentración del anión del compuesto nitroaromático, y la concentración del etóxido, el que depende de la concentración de etanol y de hidróxido de sodio en el sistema.

En el trabajo experimental se han elegido tanto la concentración

del compuesto nitroaromático como la concentración de etóxido, esta última dada por la concentración de etanol y de hidróxido de sodio (Anexo 2), las que pueden ser consultadas en la Tabla 2; decidiéndose efectuar el desarrollo colorimétrico en función de la temperatura para caracterizar las variables dependientes antes mencionadas, debido a que esta variable independiente es sencilla de modificar y controlar en el laboratorio además de que podrá permitir indicar cual de los 2 modelos propuestos puede ser utilizado en un futuro para optimizar el desarrollo colorimétrico.

Cardenólido	Nerifolina	Nerifolina
Compuesto Nitroaromático	Ácido Pírico	Ácido 3,5 Dinitrobenzoico
Concentración del compuesto nitroaromático	2.619 mM	18.857 mM
Base	Hidróxido de Sodio	Hidróxido de Sodio
Concentración de la base	34.872 mM	81.118 mM
Disolvente	Etanol al 50%	Etanol al 50%
Concentración de etóxido	0.523 mM	1.217 mM
Concentración de hidróxido	34.349 mM	79.901 mM

Tabla 2. Composición de los Sistemas Reaccionantes en el Trabajo Experimental.

H I P O T E S I S

La cuantificación colorimétrica de los cardenólidos en medio básico se fundamenta en la respuesta física a la absorción de un haz de luz monocromático por la concentración del complejo de Meisenheimer en el medio.

Una de las coordenadas en un sistema reaccionante lo es el tiempo, con el que se relaciona la dinámica de la concentración de las moléculas reaccionantes en este. Si la dinámica de la concentración del complejo de Meisenheimer o una variable de respuesta que se relacione con esta; puede predecirse y modificarse, esto debe permitir desarrollar racionalmente una técnica colorimétrica para la cuantificación de tevetósidos cardiotónicos.

O B J E T I V O S

- 1) Determinar las condiciones para efectuar la comprobación de un modelo que prediga la dinámica de una variable de respuesta que se relacione con la concentración del complejo de Meisenheimer.
- 2) Comprobar que el modelo predice la dinámica de la variable de respuesta relacionada con la concentración del complejo de Meisenheimer.
- 3) Modificar la variable de respuesta relacionada con el complejo de Meisenheimer.
- 4) Desarrollar una técnica colorimétrica para la cuantificación de tevetósidos cardiotónicos.

Embases oscuros de vidrio de 250 ml
Matraces aforados de 10, 50, y 100 ml
Pipetas volumetricas de 1, 5, y 10 ml
Pipetas graduadas de 1 ml
Probetas graduadas de 100 ml
Tubos de ensayo
Vasos de precipitado de 100 ml
Vidrios de reloj
Balanza analítica
Baño de incubación
Bomba de vacío
Cronómetro
Espátulas
Espectrofotómetro de doble haz con registrador y baño termostático
Estufa de vacío
Gradillas metálicas
Gradillas para baño de incubación
Termómetros
Parrilla eléctrica
Ácido pícrico grado analítico
Ácido 3,5 dinitrobenzoico*
Etanol grado analítico
Nerifolina**
Papel glasín
Papel negro

* El ácido 3,5 dinitrobenzoico fue sintetizado y recristalizado en etanol (punto de fusión 205°-207° C), por el alumno Juan Aguilar en el laboratorio de Materias Primas y Síntesis de Medicamentos I en la ENEP Zaragoza.

**La nerifolina fue aislada y purificada a partir de semillas de T. nerifolia (punto de fusión 215° C) por el tesista Ramón Rodríguez en la ENEP Zaragoza.

DESARROLLO

CONSIDERACION PREVIA

Se ha hablado de una variable de respuesta la que se relacione con la concentración del complejo de Meisenheimer, la cual permita cumplir con los objetivos mediante la experimentación. Dicha variable por lo antes expuesto debe de ser la absorción del complejo.

El esquema metodológico para la experimentación en ambos sistemas reaccionantes (Tabla 2), a los que se nombran Sistema Nerifolina-Picrato y Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato, se le dividió en tres fases.

La Fase I consta de 4 experimentos:

I Elección de la Solución de Referencia para las Lecturas de Absorbancia del Complejo de Meisenheimer.

II Espectro de Absorción del Complejo de Meisenheimer.

III Estabilidad del Complejo de Meisenheimer.

IV Obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el Complejo de Meisenheimer.

Al cumplir estos experimentos se tendrá la longitud de onda para efectuar la lectura de absorbancia del complejo, y la solución de referencia a utilizar, además de tener como referencia un desarrollo empírico de una técnica para la cuantificación de tevetósidos cardigónicos mediante el análisis del componente único (Anexo 3).

La Fase II consta de 2 experimentos:

V Cinética del Complejo de Meisenheimer en función de la Temperatura.

VI Cinética Bitérmica del Complejo de Meisenheimer.

Debido a la influencia que tiene la temperatura en la dinámica de la concentración de una molécula reaccionante (Anexo 4), estos dos experimentos deben de dar los parámetros del modelo, que prediga la cinética de la concentración del complejo, el discernimiento entre los dos modelos propuestos, además de indicar racionalmente el tiempo en efectuar la

lectura de absorbancia del complejo.

Y la Fase III consta de un experimento:

VII Obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el Complejo de Meisenheimer en función del Estudio Cinético.

Este deberá indicar si el desarrollo racional mejora o no algunos indicadores de la técnica como la sensibilidad y precisión respecto de la técnica desarrollada empíricamente.

DESARROLLO DEL TRABAJO, RESULTADOS, Y DISCUSIONES

EXPERIMENTO I

Nombre: Elección de la Solución de Referencia para las Lecturas de Absorbancia del Complejo de Meisenheimer

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-Se marcaron 3 matraces aforados de 10 ml (A, B, C), y se agregó lo que indica la siguiente tabla a cada matraz.

Matraz	A	B	C	
	5 ml	-	-	Solución Estándar "A" de Nerifolina
a 10 ml	5 ml	-	-	Reactivo Alcalino de Picrato
-	a 10 ml	5 ml	-	Etanol
-	-	-	a 10 ml	Hidróxido de Sodio al 0.3%

-Se agitaron por inversión, y se dejaron reposar durante 20 minutos protegidos de la luz, a temperatura ambiente.

-Se determinó el espectro de absorción entre 400 y 600 nanómetros del contenido de:

A utilizando como solución de referencia a B.

A utilizando como solución de referencia a C.

B utilizando como solución de referencia a C.

Soluciones:

Disolución Madre de Nerifolina:

- Se desecó al vacío la nerifolina a 100° C, durante 2 horas.
- Se enfrió en un desecador.
- Se pesó con exactitud 30 mg de nerifolina, y se depositaron en un matraz aforado de 100 ml.
- Se disolvieron en una pequeña porción de etanol, se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente, y se agitó por inversión.

Solución Estándar "A" de Nerifolina:

- Se transfirió 5 ml de la Disolución Madre de Nerifolina a un matraz aforado de 50 ml, con una pipeta volumétrica de 5 ml.
- Se llevó a la marca de aforo con etanol y se agitó por inversión.

Reactivo Alcalino de Picrato:

Disolución de Hidróxido de Sodio al 3% (B)

- Se pesó 3 g de hidróxido de sodio y se depositaron en un matraz aforado de 100 ml.

-Se disolvieron en 50 ml de agua, ya frío el matraz se completó a la marca de aforo con el mismo disolvente, se agitó por inversión, y se guardó en un envase de plástico.

Disolución de Ácido Pícrico al 0.6% (C)

- Se pesó 600 mg de ácido pícrico y se depositaron en un matraz aforado de 100 ml.

-Se agregó 25 ml de agua caliente y se disolvieron, ya frío el matraz se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente, y se agitó por inversión.

- Se guardó el contenido del matraz en un frasco de vidrio color ámbar.

-Se transfirió 10 ml de (B) con una pipeta volumetrica y 20 ml de (C) también con una pipeta volumetrica a un matraz aforado de 100 ml.

-Se completó a la marca de aforo con agua, y se agitó por inversión. Este reactivo se prepara antes de su uso.

Hidróxido de Sodio al 0.3%

-Se transfirió 10 ml de (B) con una pipeta volumetrica a un matraz aforado de 100 ml, se llevo al aforo con agua, y se agitó por inversión.

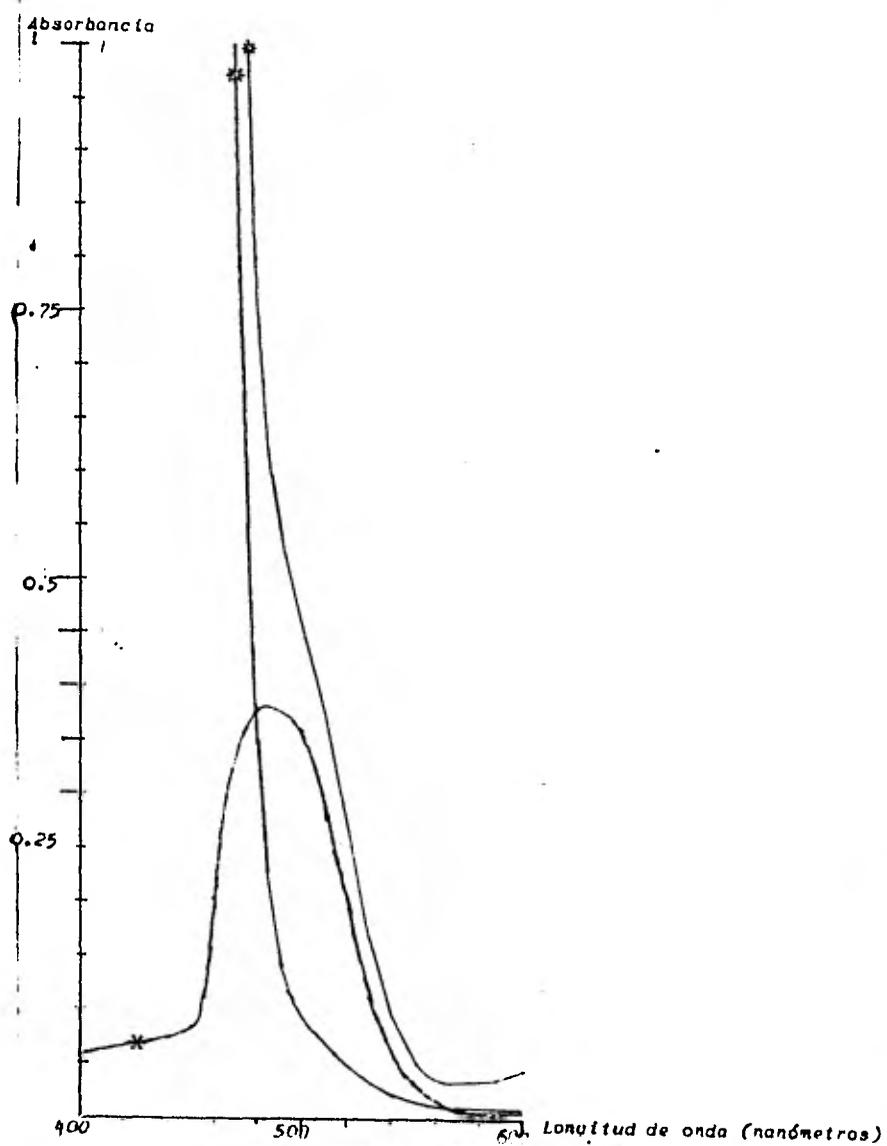
-Se guardó en un embase de plástico.

Resultados:

Hay absorción por parte del picrato en el rango de máxima absorción del complejo nerifolina-picrato como se puede observar en la gráfica número uno.

Discusiones:

La forma del espectro de absorción reportada en condiciones experimentales semejantes a las nuestras por Rowson en 1952, y Demmoen y Jannsen en 1953, para la digitoxina es semejante al encontrado debido a que la aglucona de la nerifolina y la digi toxina es la misma y se ha de utilizar como solución de referencia una solución que tenga la misma constitución de la solución a determinarle su absorbancia a excepción del cardenólido, debido a la absorción que presenta el reactivo alcalino de picrato en el intervalo de máxima absorción del complejo nerifolina-picrato. Dicha absorción puede ser causada, en base a las publicaciones de Rochester y Cold en 1964, al extrapolar el comportamiento de metóxido a etóxido como nucleófilo, a la formación de un complejo con el ión picrato; ya que la absorción de este último en soluciones de hidróxido de sodio se localiza a longitudes de onda menores de 480



Gráfica 1. Espectro de Absorción del Complejo Nerifolina-Picrato (*), Picrato (*), y Complejo Nerifolina-Picrato Picrato (*).

nanómetros.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-Se marcaron 3 matraces aforados de 10 ml (A, B, C), y se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Matraz	A	B	C	
	3 ml	-	-	Disolución Estándar "D" de Nerifolina
	-	3 ml	5 ml	Etanol
	5 ml	5 ml	a 10 ml	Hidróxido de Sodio al 0.8%
	a 10 ml	a 10 ml	-	Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%

-Se agitó por inversión, y se dejó reposar por 4 minutos a temperatura ambiente.

-Se determinó el espectro de absorción de 400 a 700 nanómetros del contenido de:

A utilizando como solución de referencia a B

A utilizando como solución de referencia a C

B utilizando como solución de referencia a C

Soluciones:

Disolución Estándar "D" de Nerifolina:

-Se desecó al vacío la nerifolina a 100° C por 2 horas.

-Se enfrió en un desecador.

-Se pesó con exactitud 40 mg de nerifolina, y se depositaron en un matraz aforado de 100 ml.

-Se disolvieron en una porción de etanol, se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente, y se agitó por inversión.

Hidróxido de Sodio al 0.8%

-Se pesó 0.8 g de hidróxido de sodio, se disolvieron en 100 ml de agua, y la disolución se guardó en un embase de plástico.

Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%

-Se peso 2 g de ácido 3,5 dinitrobenzoico, se disolvieron en 100 ml de etanol, y la disolución se guardó en un embase de vidrio color ambar.

Resultados:

No se observa absorción del 3,5 dinitrobenzoato en el intervalo de máxima absorción del complejo nerifolina-3,5 dinitrobenzoato como se puede apreciar en la gráfica dos.

Discusiones:

La forma del espectro de absorción del complejo Nerifolina-3,5 dinitrobenzoato obtenida, es semejante al reportado por Rowson en 1952, y Pratt también en el mismo año, usando estos como cardenólido a la digitoxina en condiciones ensayadas semejantes a las nuestras; lo que apoya la localización de la reacción en la genina lo que ya se había observado en el Sistema Nerifolina-Picrato. La solución de referencia a utilizar puede ser indistintamente la que contenga o no al ácido 3,5 dinitrobenzoico (B o C), aunque en un futuro se usará la (B).

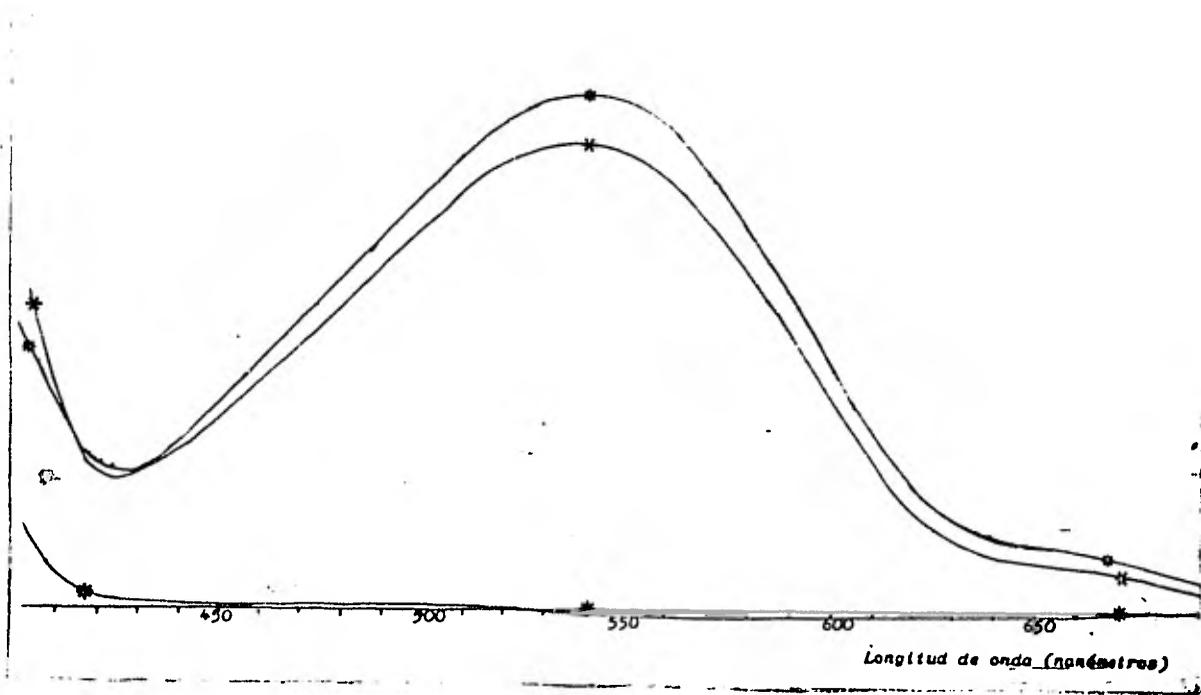
EXPERIMENTO II

Nombre: Espectro de Absorción del Complejo de Meisenheimer

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-Se marcaron 4 matraces aforados de 10 ml (A, B, C, D) y se agregó lo que indica la siguiente tabla:



Gráfica 2. Espectro de Absorción del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato (*), 3,5 Dinitrobenzoato (*), y Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato (*).

Matraz	A	B	C	D	
	5 ml	3 ml	1 ml	-	Solución Estándar "B" de Nerifolina
	-	2 ml	4 ml	5 ml	Etanol
	a 10 ml	a 10 ml	a 10 ml	a 10 ml	Reactivo Alcalino de Picrato

-Se agitó por inversión y se dejó reposar por 20 minutos protegiendo de la luz, a temperatura ambiente.

-Se determinó el espectro del contenido de A, B, y C, usando como solución de referencia el contenido de D entre 400 y 600

nanómetros.

∴

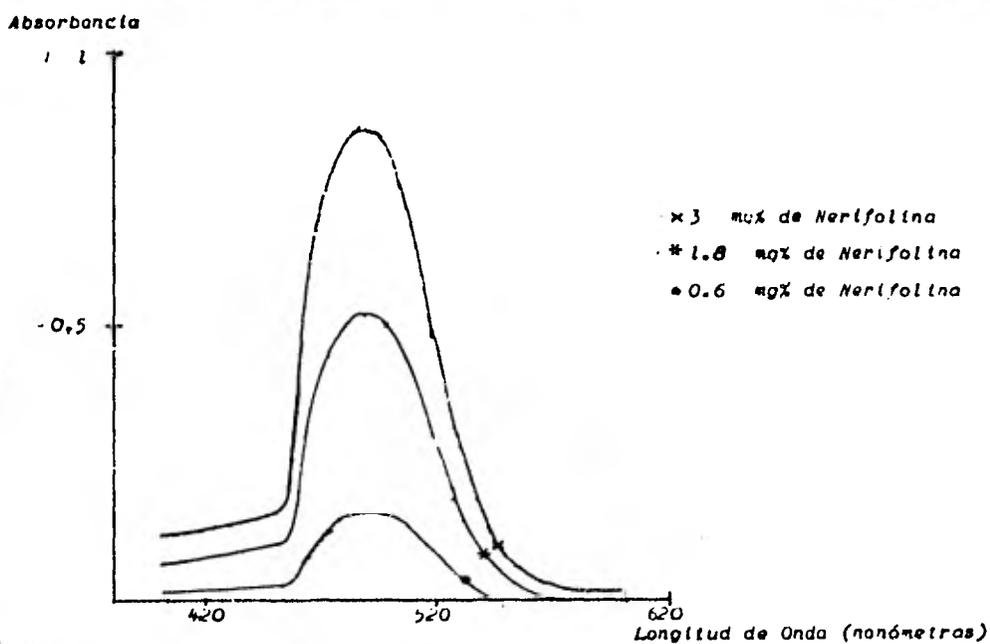
Soluciones:

Solución Estándar "B" de Nerifolina

-Se transfirió 10 ml de la Disolución Madre de Nerifolina con una pipeta volumétrica a un matraz aforado de 50 ml, se llevó a la marca con etanol, y seagitó por inversión.

Resultados:

La máxima absorción del complejo a una concentración máxima experimentada de 3 mg% de nerifolina se localizó en el intervalo de 486 a 492 nanómetros mediante la determinación en la gráfica tres.



Gráfica 3. Espectro de Absorción del Complejo Nerifolina-Picrato a varias concentraciones de Nerifolina.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-Se marcaron 5 tubos de ensayo (A, B, C, D, E) y se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubos	A	B	C	D	E	
	0.5 ml	1 ml	2 ml	3 ml	-	Disolución Estándar "E" de Nerifolina
	2.5 ml	2 ml	1 ml	2 ml	5 ml	Etanol
	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	Hidróxido de Sodio al 0.8%
	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%

-Se agitó mecánicamente y se dejó reposar 4 minutos a temperatura ambiente.

-Se determinó el espectro de absorción del contenido de los tubos A, B, C, y D usando como solución de referencia el contenido del tubo E.

Soluciones:

Disolución Estándar "E" de Nerifolina:

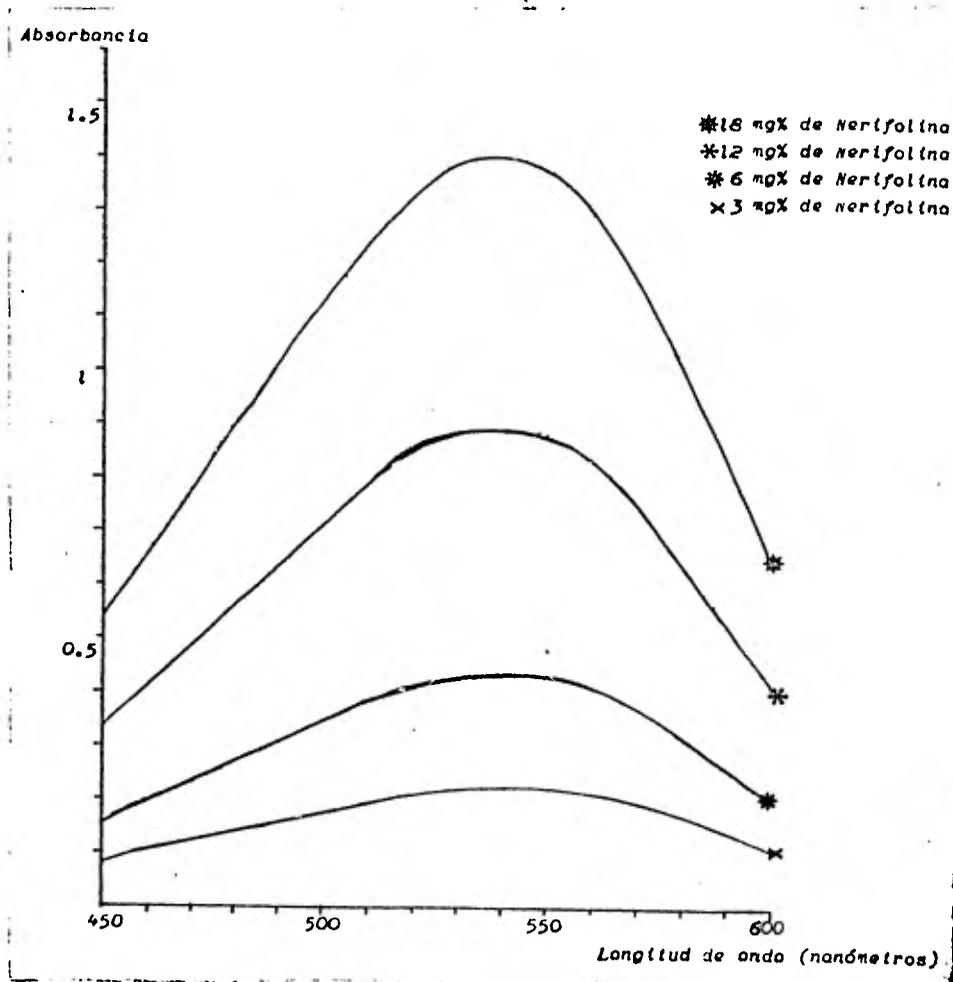
-Se desecó al vacío la nerifolina a 100° C durante 2 horas.

-Se enfrió en un desecador.

-Se pesó con exactitud 60 mg de nerifolina, se depositaron en matraz aforado de 100 ml, se disolvieron en una porción de etanol, se llevó a la marca con el mismo disolvente, y se agitó por inversión.

Resultados:

La máxima absorción del complejo a una concentración máxima de 18 mg% de nerifolina se encuentra en el intervalo de 536 a 542 nanómetros, al determinarle en la gráfica tres.



Gráfica 4. Espectro de Absorción del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a varias concentraciones de Nerifolina.

EXPERIMENTO III

Nombre: Estabilidad del Complejo de Meisenheimer

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-Se agregó a 3 celdas del espectrofotómetro lo que indica la siguiente tabla (2 celdas para B):

Celda	A	B	
	1.5 ml	-	Solución Estándar "A" de Nerifolina.
	-	1.5 ml	Etol
	1.5 ml	1.5 ml	Reactivo Alcalino de Picrato

-Se agitó por inversión y se registró en el graficador la absorbancia del complejo a 490 nanómetros por un tiempo aproximado de una hora a una temperatura cercana a los 20° C.

Resultados:

El barrido de la absorbancia del complejo se puede observar en la gráfica cinco.

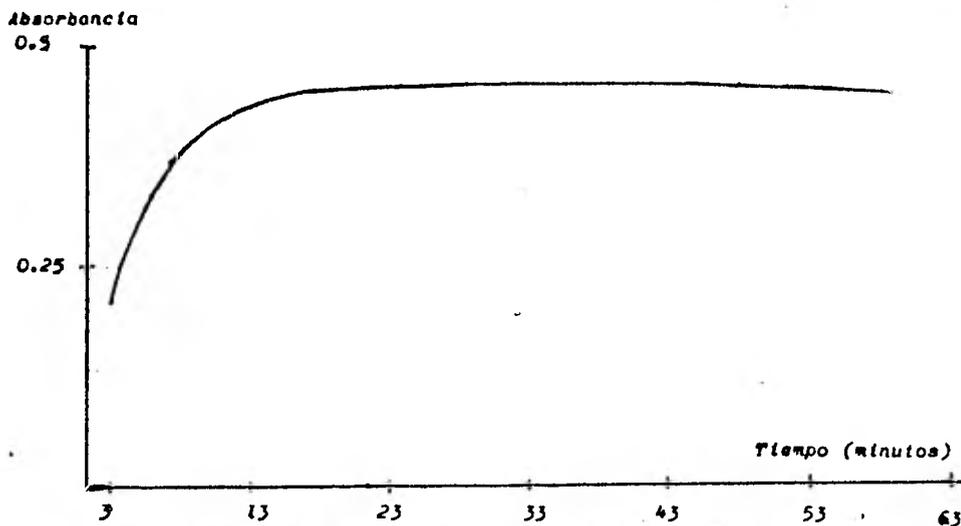
Discusiones:

La estabilidad del complejo a una temperatura de incubación (T_i) de 20° C a 490 nanómetros indicó que entre los 25 y 40 minutos la absorbancia es máxima y sin algún cambio significativo en esta, siendo la evaluación exclusivamente gráfica. Por lo que se eligió como tiempo de desarrollo del complejo (t_d) a 30 minutos, a la temperatura experimentada.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-Se agregó a 3 celdas del espectrofotómetro lo que indica la siguiente tabla (2 celdas para B):



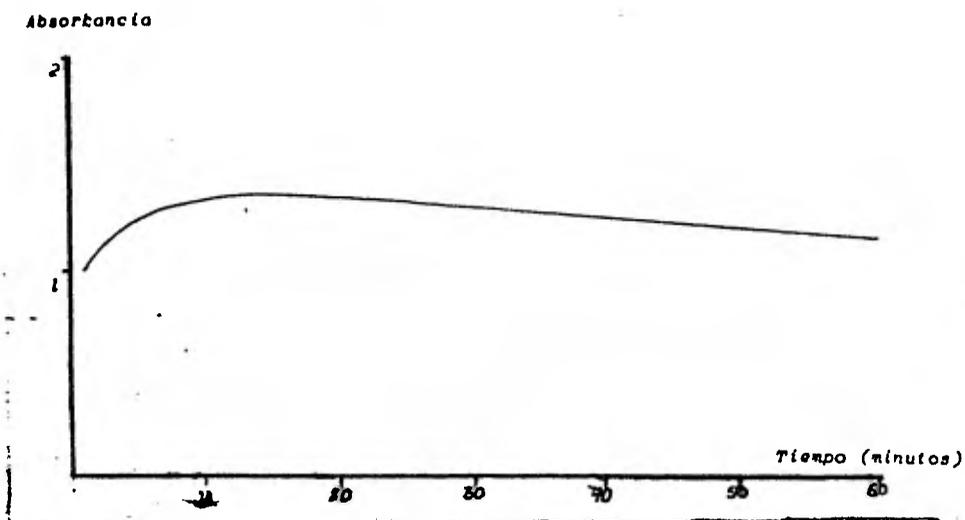
Gráfica 5. Absorbancia del Complejo Nerifolina-Picrato, a 490 nanómetros en función del Tiempo a una Temperatura de Incubación de 20° C.

Celda	A	B	
	0.9 ml	-	Disolución Estándar "D" de Nerifolina
	-	0.9 ml	Etanol
	0.6 ml	0.6 ml	Hidróxido de Sodio al 0.8%
	1.5 ml	1.5 ml	Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%

-Se agitó por inversión, y se registró en el graficador la absorbancia del complejo a 538 nanómetros hasta los 75 minutos a una temperatura cercana a los 16° C.

Resultados:

El barrido de la absorbancia del complejo se puede apreciar en la gráfica seis.



Gráfica 6. Absorbancia del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 538 nanómetros en función del Tiempo a una Temperatura de Incubación de 16° C.

Discusiones:

La estabilidad del complejo a una temperatura de incubación de 16° C (T_i) a 538 nanómetros reportó que entre los 12 y los 18 minutos la absorbancia del complejo es máxima sin algún cambio gráfico apreciable en esta, por lo que se eligió como tiempo de desarrollo del complejo (t_d) a 12 minutos a la temperatura ensayada.

EXPERIMENTO IV

Nombre: Obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el Complejo de Moisenheimer

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-Se marcaron 25 tubos de ensaye (4 con A, 4 con B, 4 con C, 4 con D, 4 con E, y 5 con F) y se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubo	A	B	C	D	E	F	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	-	Solución Estándar "C" de Nerifolina
	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	-	5 ml	Etanol

-Se agregó a los tubos marcados con A y a un tubo marcado con F 5 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, se agitó mecánicamente, y se dejó reposar por 30 minutos a 20° C protegidos de la luz.

-Se determinó la lectura de absorbancia del contenido de los tubos A a 488, 490, y 492 nanómetros (asignadas al azar) utilizando como solución de referencia al contenido del tubo F.

-Se efectuó el mismo procedimiento para el contenido de los tubos B, C, D, y E.

Soluciones

Solución Estándar "C" de Nerifolina

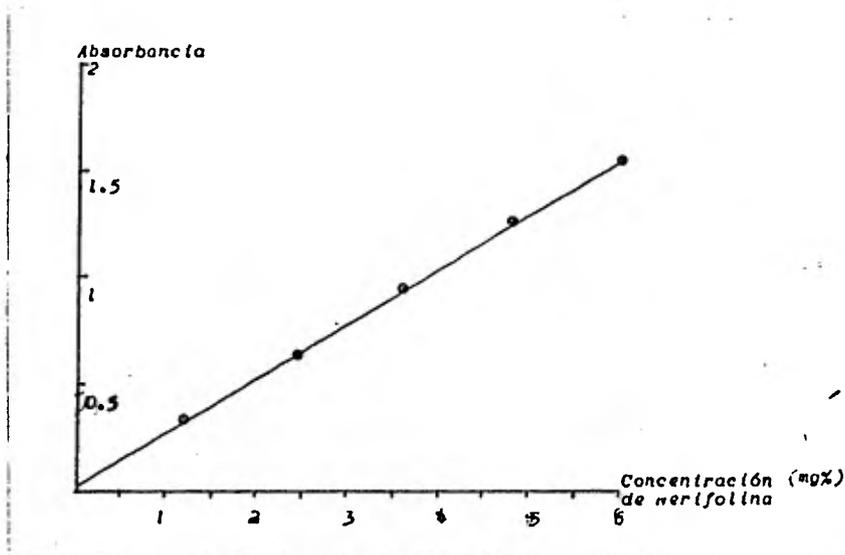
-Se transfirió 40 ml de la Disolución Madre de Nerifolina con una pipeta volumétrica a un matraz aforado de 100 ml, se llevo a la marca de aforo con etanol, y se agitó por inversión.

Resultados:

Longitud de onda (nanómetros)	Concentración de Nerifolina (mg%)				
	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0
488	0.331	0.648	0.943	1.267	1.527
	0.322	0.655	0.951	1.263	1.530
	0.310	0.648	0.948	1.271	1.566
	0.331	0.643	0.956	1.265	1.537
490	0.311	0.644	0.957	1.264	1.543
	0.331	0.649	0.954	1.267	1.541
	0.331	0.657	0.966	1.273	1.575
	0.322	0.649	0.949	1.263	1.549
492	0.312	0.647	0.948	1.255	1.531
	0.323	0.645	0.962	1.254	1.570
	0.331	0.646	0.953	1.265	1.543
	0.331	0.645	0.955	1.255	1.533

Discusiones:

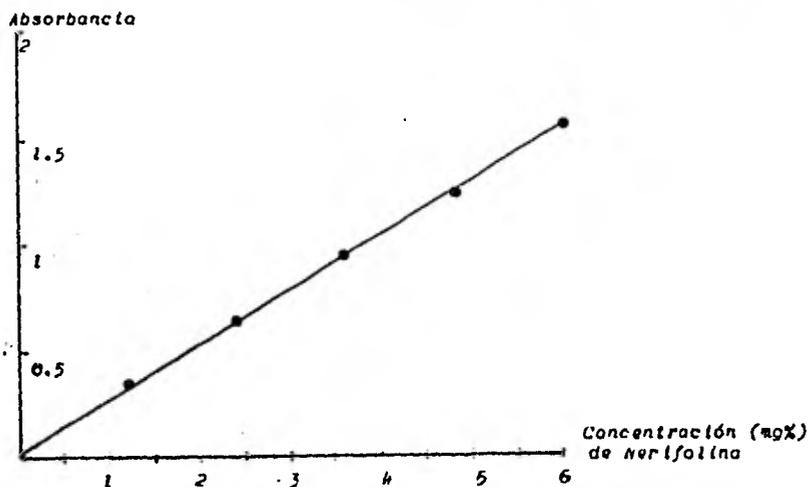
Las estadísticas del análisis de regresión y correlación (Tabla 1), y las rectas de regresión respectivas (Gráficas 7, 8, y 9) sugieren que bajo las condiciones experimentadas la obediencia a la Ley de Lambert-Beer por parte del Complejo Nerifolina-Picrato, es muy semejante a 488, 490, y 492 nanómetros. Ya que el diseño experimental fue ideado para determinar el efecto de la longitud de onda en los modelos lineales de regresión ($Abs = m(N) + b + c$), al aplicar a los datos un análisis de covarianza (Tabla 2); este indicó que las diferencias observadas en las estadísticas de regresión y correlación son debidas al error experimental (c), ya que la hipótesis nula, de que existe igualdad en los modelos de regresión lineal a las 3 diferentes longitudes de onda es aceptada ($F \leq 0.01$), debido a que el valor calculado del estadígrafo de contraste (F_{cal}) es menor que la unidad y por lo tanto no es necesario compararlo con el valor $F_{4,58;0.99}$ que es mayor que la unidad. Ya que se tiene que elegir una longitud de onda para cumplir el objetivo número uno



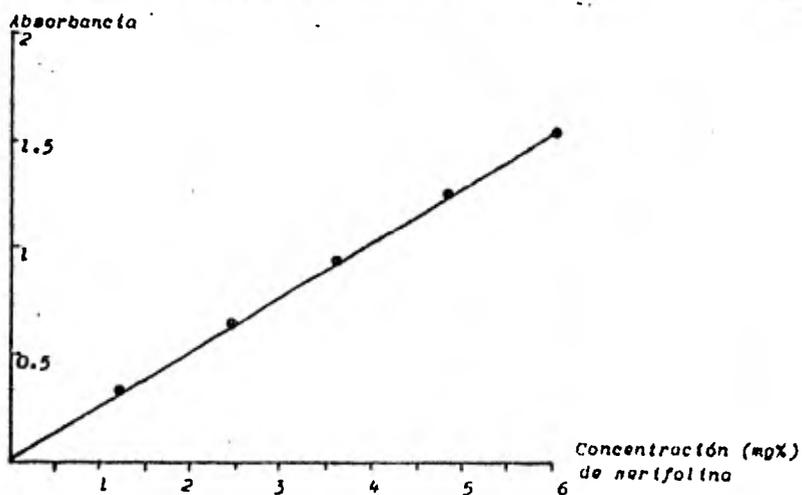
Gráfica 7. Recta de Regresión por mínimos cuadrados a la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-Picrato a 488 nm.

Longitud de onda (nm)	488	490	492
Coefficiente de Correlación (10^{-3})	999.419	999.575	999.595
Coefficiente de Regresión (Abs/mg%)(10^{-3})	254.250	256.125	254.292
Ordenada al Origen (Abs)(10^{-3})	30.300	27.700	29.750
Error Típico de Estimación (Abs)(10^{-3})	15.509	13.360	12.953

Tabla 1. Estadísticas de Regresión y Correlación por mínimos cuadrados a la Obediencia de la Ley de Lambert-Beer del Complejo Nerifolina-Picrato.



Gráfica 9. Recta de Regresión por mínimos cuadrados a la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-Picrato a 492 nm.



Gráfica 8. Recta de Regresión por mínimos cuadrados a la obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-Picrato a 490 nm.

λ	$\sum x^2$	$\sum xy$	$\sum y^2$	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F
488	57.6	14.6448	3.72777	$4.3296(10^{-3})$			
490	57.6	14.7528	3.78177	$3.2091(10^{-3})$			
492	57.6	14.6472	3.72768	$3.0191(10^{-3})$			
Dentro	172.8	44.0448	11.23722	$1.05578(10^{-2})$	54	$1.95515(10^{-4})$	
Entre	0.0	0.0000	$2.5765(10^{-4})$				
Total	172.8	44.0448	11.23748	$1.09499(10^{-2})$	58		
Diferencia				$3.29100(10^{-4})$	4	$9.80250(10^{-5})$	0.50

Tabla 2. Análisis de Covarianza para H_0 :

$$b_{488} + m_{488}(N) = b_{490} + m_{490}(N) = b_{492} + m_{492}(N)$$

se construyó la siguiente tabla:

Longitud de onda (nm)	Error Típico de Estimación Relativo (%)	Estimación del Intervalo (Confianza del 99%) para la predicción inversa cuando la Absorbancia $I = (m\%)$
488	0.775	3.814 ± 0.17994
490	0.668	3.796 ± 0.15386
492	0.648	3.816 ± 0.15026

Donde se observa que el error típico relativo ($S_{yx}/2$)² ocurre a 492 nanómetros, por lo que el intervalo de predicción inversa (ejemplo Abs=1) da intervalos más pequeños y por lo tanto más precisos, por esto las lecturas de absorbancia del complejo se deben de efectuar a esa longitud de onda. Este criterio fue usado debido a la naturaleza del uso de las curvas de calibración en la colorimetría.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-Se prepararon diluciones a partir de la Disolución Estándar "F" de Nerifolina, las cuales contengan respectivamente 10 mg% (1), 30 mg% (2), 40 mg% (3), 50 mg% (4), y 60 mg% (5).

-Se marcaron 20 tubos de ensayo (3 con A, 3 con B, 3 con C, 3 con D, 3 con E, 5 con F) y se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubo	A	B	C	D	E	F	
	2 ml (1)	2 ml (2)	2 ml (3)	2 ml (4)	2 ml (5)	2 ml (6)	Dilución de la Disolución Estándar "F" de Nerifolina
	1 ml	Etanol					

-Se agregó a los tubos marcados con A y a un tubo marcado con F, 5 ml de Hidróxido de Sodio al 0.8%, 2 ml de Acido 3,5 Dinitro benzoico, y se dejó reposar a una temperatura de 16° C por 12 minutos.

-Se determinó la absorbancia del contenido de los tubos A a 536, 538, y 540 nanómetros (asignadas al azar), usando como solución de referencia al contenido del tubo F.

-Se efectuó el mismo procedimiento para el contenido de los tubos B, C, D, y E.

Soluciones

Disolución Estándar "F" de Nerifolina

-Se desecó al vacío la nerifolina a 100° C durante 2 horas.

-Se enfrió en un desecador.

-Se pesó con exactitud 50 mg de nerifolina, se depositaron en un matraz aforado de 50 ml, y se disolvieron en una porción de etanol.

-Se llevo a la marca de aforo con el mismo disolvente, y se agitó por inversión.

Diluciones de la Disolución Estándar "F" de Nerifolina

-Se marcaron 5 matraces aforados de 10 ml (1, 2, 3, 4, 5) y se agregó lo que indica la siguiente tabla.

Matraz	1	2	3	4	5	Disolución Estándar "F" de Nerifolina
	1 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	

-Se llevó a la marca de aforo con etanol y se agitó por inversión.

Resultados:

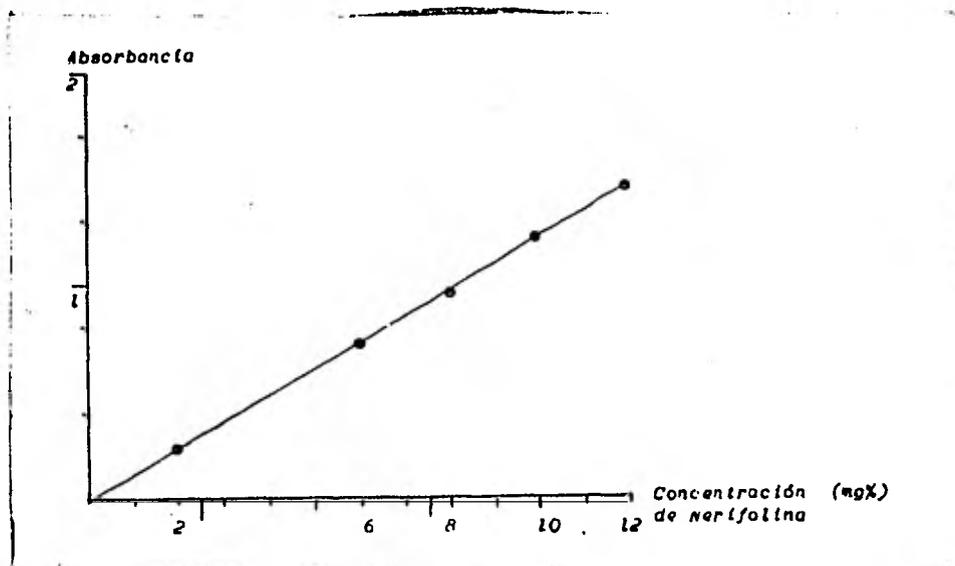
Longitud de onda (nanómetros)	Concentración de Nerifolina (mg%)				
	2	6	8	10	12
536	0.235	0.717	0.957	1.221	1.452
	0.231	0.723	0.971	1.210	1.463
	0.235	0.717	0.975	1.215	1.464
538	0.237	0.729	0.980	1.219	1.467
	0.235	0.721	0.959	1.225	1.451
	0.233	0.720	0.972	1.225	1.459
540	0.235	0.735	0.960	1.226	1.463
	0.239	0.725	0.982	1.220	1.467
	0.237	0.727	0.975	1.228	1.452

Discusiones:

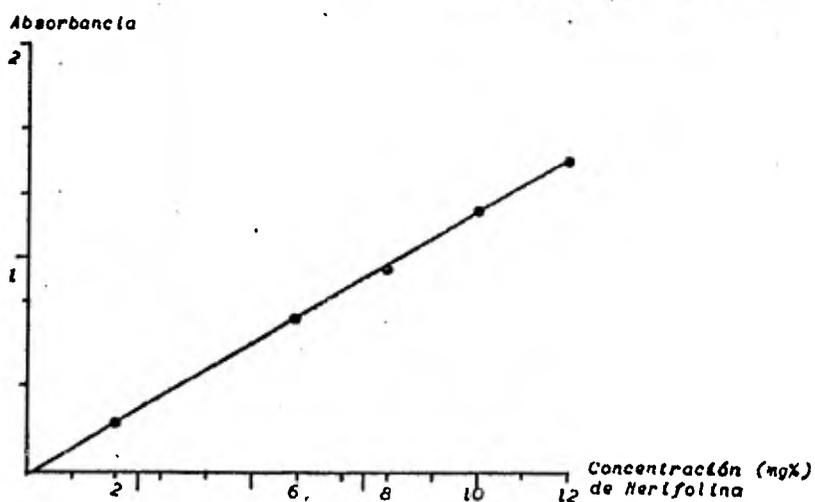
Las estadísticas del análisis de regresión lineal y correlación (Tabla 3), y las rectas de regresión respectivas (Gráficas 10, 11, y 12) sugieren que bajo las condiciones experimentadas la obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitro benzoato es muy parecida a 536, 538, y 540 nanómetros. Ya que el experimento fue diseñado para determinar el efecto de la longitud

Longitud de onda (nm)	536	538	540
Coefficiente de Correlación (10^{-3})	999.921	999.888	999.885
Coefficiente de Regresión (Abs / mg%) (10^{-3})	122.761	122.797	122.660
Ondenada al Origen (Abs) (10^{-3})	-13.919	-11.126	-7.482
Error Típico de Estimación (Abs) (10^{-3})	5.917	7.044	7.128

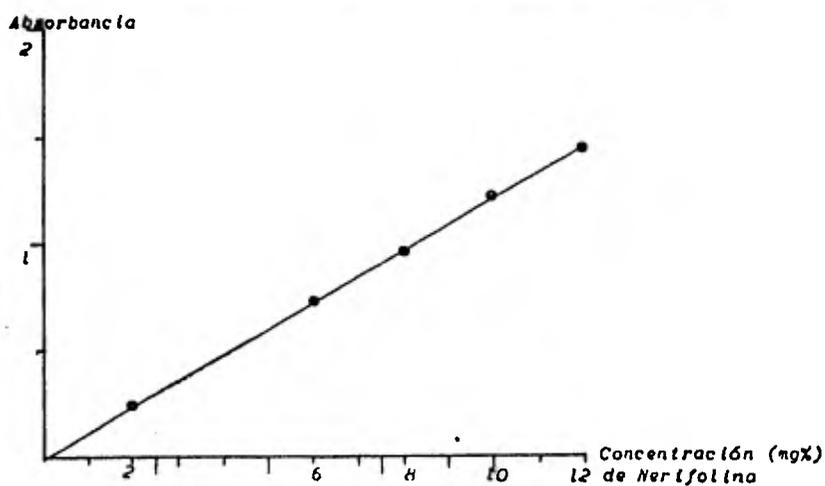
Tabla 3. Estadísticas de Regresión y Correlación por mínimos cuadrados a la Obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato.



Gráfica 10. Recta de Regresión por mínimos cuadrados que muestra la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 536 nm.



Gráfica 11. Recta de Regresión por mínimos cuadrados a la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 538 nm.



Gráfica 12. Recta de Regresión por mínimos cuadrados a la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 540 nm.

de onda en los modelos lineales de regresión ($Abs = m(N) + b + e$) un análisis de covarianza a los datos (Tabla 4) indicó que las diferencias en las estadísticas de regresión y correlación son debidas al error experimental y no al efecto de las longitudes de onda $P (0.01)$ ya que el valor de F_{cal} mediante el análisis de covarianza es menor que el valor de $F_{4,39;0.99}$ y por ende todos los datos se ajustan a un mismo modelo lineal de regresión. Debido a la necesidad de elegir una de las 3 longitudes de onda se construyo la siguiente tabla:

<i>Longitud de onda (nm)</i>	<i>Error Típico de Estimación Relativo (%)</i>	<i>Estimación del Intervalo (Confianza del 99%) para la predicción inversa (Abs=1) (mg%)</i>
536	0.296	$8.259 \pm 0.14998 (1.82\%)$
538	0.352	$8.234 \pm 0.17850 (2.17\%)$
540	0.356	$8.214 \pm 0.18082 (2.20\%)$

En esta se observa que el valor mínimo del error típico de estimación relativo ($S_{yx}/2$)% ocurre a 536 nanómetros , y por consi guiente el intervalo de predicción inversa a la mencionada longitud de onda (ejemplo $Abs=1$) es más preciso, por lo que a 536 nanómetros tendrán lugar las lecturas de absorbancia del complejo en los expe rimentos subsiguientes.

EXPERIMENTO V

Nombre: Cinética del Complejo de Meisenheimer en función de la Temperatura.

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-Se agregó a 3 celdas del espectrofotómetro lo que indica la siguiente tabla (2 celdas para B):

λ	$\sum x^2$	$\sum xy$	$\sum y^2$	Residual	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_{cal}	$F_{4,39;0.99}$
536	177.6	21.8024	2.67691	$4.2481(10^{-4})$				
538	177.6	21.8088	2.67866	$6.0203(10^{-4})$				
540	177.6	21.7844	2.67269	$6.1639(10^{-4})$				
				<u>$1.64323(10^{-3})$</u>	39	$4.2134(10^{-5})$		
Dentro	532.8	65.3956	8.02827					
Entre	0.0	0.0000	$6.16390(10^{-4})$					
Total	532.8	65.3956	8.02851	<u>$1.88642(10^{-3})$</u>	43			
Diferencia				<u>$2.43194(10^{-4})$</u>	4	$6.07985(10^{-5})$	1.44	5.74

Tabla 4. Análisi de Covarianza para H_0 :

$$b_{536} + m_{536}(N) = b_{538} + m_{538}(N) = b_{540} + m_{540}(N)$$

Celda	A	B
	1.5 ml	- Solución Estándar "C" de Nerifolina
	-	1.5 ml Etanol
	1.5 ml	1.5 ml Reactivo Alcalino de Picrato

-Se agitó por inversión, se registró en el graficador además de anotar las lecturas de absorbancia del complejo a 492 nanómetros hasta un tiempo de 75 minutos, a una temperatura cercana a los 50° C, utilizando a B como referencia.

-Se repitió el experimento utilizando temperaturas cercanas a 40° C, 30° C, 20° C, 15° C, 10° C, y 5° C respectivamente.

Resultados:

Pasar a la siguiente página.

\bar{T} 51.15 \bar{T} 51.15 \bar{T} 40.0

tiempo (seg)	lectura (Abs.)	tiempo (seg)	lectura (Abs.)	tiempo (seg)	lectura (Abs.)
150	0.834	1590	0.665	150	0.891
180	0.914	1620	0.659	180	0.979
210	0.970	1650	0.653	210	1.046
240	1.011	1680	0.648	240	1.100
270	1.032	1710	0.643	270	1.139
300	1.040	1740	0.637	300	1.171
330	1.044	1770	0.631	330	1.196
360	1.041	1800	0.626	360	1.213
390	1.034	1860	0.616	390	1.227
420	1.025	1920	0.606	420	1.238
450	1.013	1980	0.596	450	1.244
480	1.000	2040	0.586	480	1.251
510	0.984	2100	0.577	510	1.251
540	0.968	2160	0.568	540	1.249
570	0.952	2220	0.559	570	1.249
600	0.937	2280	0.550	600	1.246
630	0.924	2340	0.542	630	1.242
660	0.911	2400	0.534	660	1.235
690	0.898	2460	0.525	720	1.231
720	0.886	2520	0.517	750	1.226
750	0.875	2580	0.510	780	1.222
780	0.863	2640	0.502	810	1.217
810	0.853	2760	0.487	840	1.212
840	0.843	2880	0.472	870	1.207
870	0.833	3120	0.446	900	1.203
900	0.824	3240	0.433	930	1.201
930	0.815	3360	0.422	960	1.193
960	0.806	3480	0.410	990	1.188
990	0.797	3600	0.400	1020	1.184
1020	0.789	3840	0.379	1050	1.178
1050	0.782	3920	0.370	1080	1.174
1080	0.776	4140	0.356	1110	1.169
1110	0.769	4320	0.344	1140	1.165
1140	0.763	4500	0.333	1170	1.160
1170	0.756			1200	1.155
1200	0.749			1230	1.151
1230	0.742			1260	1.146
1260	0.735			1290	1.141
1290	0.727			1320	1.137
1320	0.721			1350	1.133
1350	0.715			1380	1.128
1380	0.708			1410	1.124
1410	0.701			1440	1.119
1440	0.695			1470	1.115
1470	0.689			1500	1.110
1500	0.683			1530	1.106
1530	0.677			1560	1.102
1560	0.670			1590	1.098
				1620	1.093

\bar{T} 40.0

\bar{T} 31.6

\bar{T} 31.6

tiempo (seg)	lectura (Abs)	tiempo (seg)	lectura (Abs)	tiempo (seg)	lectura (Abs)
1650	1.089	150	0.869	1680	1.422
1680	1.085	180	0.963	1710	1.420
1710	1.081	210	1.041	1740	1.418
1740	1.076	240	1.074	1770	1.416
1770	1.072	270	1.148	1800	1.414
1800	1.068	300	1.194	1860	1.410
1860	1.059	330	1.231	1920	1.405
1920	1.051	360	1.264	1980	1.401
1980	1.043	390	1.291	2040	1.396
2040	1.035	420	1.323	2100	1.391
2100	1.027	450	1.343	2160	1.387
2160	1.018	480	1.360	2220	1.381
2220	1.010	510	1.369	2280	1.377
2280	1.000	540	1.331	2340	1.372
2340	0.994	570	1.391	2400	1.366
2400	0.986	600	1.401	2460	1.361
2460	0.979	630	1.409	2520	1.356
2520	0.971	660	1.415	2580	1.351
2580	0.963	690	1.419	2640	1.345
2640	0.955	720	1.423	2760	1.335
2760	0.940	750	1.427	2880	1.325
2880	0.924	780	1.430	3030	1.311
3000	0.910	810	1.432	3150	1.301
3120	0.896	840	1.434	3240	1.293
3240	0.882	870	1.435	3360	1.282
3360	0.869	900	1.436	3480	1.271
3480	0.854	930	1.436	3600	1.261
3600	0.841	960	1.437	3780	1.244
3780	0.821	990	1.437	3920	1.223
3920	0.801	1020	1.435	4140	1.212
4140	0.782	1050	1.435	4320	1.196
4320	0.764	1080	1.435	4500	1.180
4500	0.746	1110	1.435		
		1140	1.434		
		1170	1.434		
		1200	1.434		
		1230	1.434		
		1260	1.434		
		1290	1.434		
		1320	1.434		
		1350	1.434		
		1380	1.434		
		1410	1.434		
		1440	1.434		
		1470	1.433		
		1500	1.432		
		1530	1.431		
		1560	1.429		
		1590	1.427		
		1620	1.425		
		1650	1.423		

\bar{T} 20.2

\bar{T} 20.2

\bar{T} 14.9

tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)
150	0.907	1650	1.582	150	0.855
180	0.965	1680	1.582	180	0.948
210	1.045	1710	1.583	210	1.024
240	1.111	1740	1.583	240	1.086
270	1.175	1770	1.583	270	1.144
300	1.224	1800	1.583	300	1.192
330	1.266	1860	1.583	330	1.240
360	1.304	1920	1.583	360	1.276
390	1.334	1980	1.583	390	1.309
420	1.362	2040	1.583	420	1.337
450	1.387	2100	1.583	450	1.366
480	1.410	2160	1.582	480	1.391
510	1.429	2220	1.581	510	1.413
540	1.446	2280	1.581	540	1.433
570	1.463	2340	1.580	570	1.452
600	1.477	2400	1.579	600	1.468
630	1.489	2460	1.578	630	1.481
660	1.501	2520	1.577	660	1.496
690	1.511	2580	1.576	690	1.515
720	1.520	2640	1.575	720	1.521
750	1.527	2760	1.573	750	1.532
780	1.534	2880	1.570	780	1.542
810	1.541	3000	1.565	810	1.551
840	1.547	3120	1.559	840	1.560
870	1.552	3240	1.554	870	1.567
900	1.557	3360	1.550	900	1.574
930	1.561	3480	1.547	930	1.581
960	1.564	3600	1.546	960	1.586
990	1.567	3780	1.543	990	1.591
1020	1.571	3990	1.540	1020	1.596
1050	1.523	4140	1.537	1050	1.601
1080	1.575	4320	1.533	1080	1.606
1110	1.577	4500	1.529	1110	1.611
1140	1.578			1140	1.614
1170	1.579			1170	1.617
1200	1.580			1200	1.621
1230	1.581			1230	1.624
1260	1.581			1260	1.626
1290	1.581			1290	1.629
1320	1.581			1320	1.631
1350	1.581			1350	1.633
1380	1.581			1380	1.635
1410	1.581			1410	1.636
1440	1.581			1440	1.638
1470	1.581			1470	1.640
1500	1.581			1500	1.641
1530	1.581			1530	1.643
1560	1.581			1560	1.644
1590	1.582			1590	1.645
1620	1.582			1620	1.645
				1650	1.646

\bar{T} 14.9 \bar{T} 9.9 \bar{T} 9.9

tiempo (seg.)	lectura (Abs)	tiempo (seg.)	lectura (Abs)	tiempo (seg.)	lectura (Abs)
1680	1.647	150	0.775	1650	1.647
1710	1.648	180	0.863	1680	1.649
1740	1.649	210	0.938	1710	1.651
1770	1.649	240	0.999	1740	1.652
1800	1.650	270	1.054	1770	1.655
1860	1.652	300	1.103	1800	1.655
1920	1.653	330	1.146	1860	1.658
1980	1.653	360	1.186	1920	1.661
2040	1.654	390	1.221	1980	1.664
2100	1.654	420	1.252	2040	1.666
2160	1.654	450	1.280	2100	1.667
2220	1.654	480	1.309	2160	1.669
2280	1.654	510	1.332	2220	1.671
2340	1.654	540	1.353	2280	1.672
2400	1.654	570	1.374	2340	1.673
2460	1.654	600	1.394	2400	1.675
2520	1.653	630	1.411	2460	1.675
2580	1.653	660	1.428	2520	1.676
2640	1.653	690	1.444	2580	1.677
2760	1.652	720	1.459	2640	1.677
2880	1.652	750	1.471	2760	1.678
3000	1.651	780	1.483	2880	1.679
3120	1.649	810	1.495	3000	1.679
3240	1.647	840	1.506	3120	1.679
3360	1.644	870	1.517	3240	1.679
3480	1.640	900	1.527	3360	1.679
3600	1.638	930	1.537	3480	1.679
3720	1.638	960	1.544	3600	1.679
4140	1.637	990	1.552	3780	1.679
4320	1.636	1020	1.559	3960	1.679
4500	1.635	1050	1.566	4140	1.679
		1080	1.573	4320	1.679
		1110	1.580	4500	1.679
		1140	1.586		
		1170	1.591		
		1200	1.596		
		1230	1.602		
		1260	1.607		
		1290	1.611		
		1320	1.615		
		1350	1.618		
		1380	1.622		
		1410	1.625		
		1440	1.628		
		1470	1.632		
		1500	1.634		
		1530	1.638		
		1560	1.639		
		1590	1.643		
		1620	1.644		

\bar{T} 4.85 \bar{T} 4.85

tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)
150	0.863	1650	1.649
180	0.949	1680	1.651
210	1.019	1710	1.653
240	1.082	1740	1.655
270	1.133	1770	1.657
300	1.177	1800	1.659
330	1.216	1860	1.661
360	1.250	1920	1.665
390	1.279	1980	1.667
420	1.407	2040	1.670
450	1.332	2100	1.673
480	1.355	2160	1.675
510	1.374	2220	1.677
540	1.393	2280	1.679
570	1.411	2340	1.681
600	1.427	2400	1.682
630	1.435	2460	1.683
660	1.449	2520	1.684
690	1.462	2580	1.685
720	1.475	2640	1.686
750	1.488	2760	1.687
780	1.499	2880	1.689
810	1.510	3000	1.689
840	1.519	3120	1.689
870	1.527	3240	1.690
900	1.537	3360	1.691
930	1.547	3480	1.691
960	1.552	3600	1.691
990	1.559	3780	1.691
1020	1.565	3960	1.691
1050	1.572	4140	1.691
1080	1.577	4320	1.691
1110	1.583	4500	1.691
1140	1.589		
1170	1.595		
1200	1.599		
1230	1.603		
1260	1.608		
1290	1.612		
1320	1.616		
1350	1.620		
1380	1.623		
1410	1.627		
1440	1.631		
1470	1.634		
1500	1.637		
1530	1.640		
1560	1.642		
1590	1.644		
1620	1.647		

\bar{T} es el promedio de las temperaturas registradas al inicio y al final del experimento.

Discusiones:

Los modelos cinéticos propuestos para predecir la absorbancia del complejo (Abs) en función del tiempo, pueden ser representados mediante la siguiente función:

$$\text{Modelo I} \quad \text{Abs} = f(t) = C(e^{-ct} - e^{-dt}) \quad \dots\dots(1)$$

$$\text{Modelo II} \quad \text{Abs} = f(t) = E(e^{-ct} - e^{-ft}) - G(e^{-ct} - e^{-dt}) \quad \dots\dots(2)$$

Los que pueden ser representados como:

$$\text{Abs} = A e^{-at} - B e^{-bt} \quad \dots\dots(3)$$

Donde para que exista la identidad se tiene que cumplir para:

Modelo I

$$A = C$$

$$B = C$$

$$e^{-at} = e^{-ct}$$

$$e^{-bt} = e^{-dt}$$

Modelo II

$$A = E$$

$$B = G$$

$$e^{-at} = e^{-ct} - e^{-ft}$$

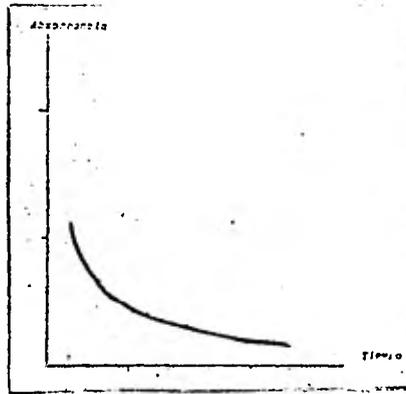
$$e^{-bt} = e^{-ct} - e^{-dt}$$

La función (3) describe una fase de formación ($B e^{-bt}$) y una fase de destrucción ($A e^{-at}$) del complejo de Meisenheimer, de la que se puede inferir 3 posibles ecuaciones resultantes dependiendo de la magnitud de la velocidad de formación (V_f) y destrucción (V_d) del complejo en el tiempo.

1) Si $V_d > V_f$ para todo tiempo, se tendrá la siguiente ecuación:

$$\text{Abs} = A e^{-at} \quad \dots\dots(4)$$

Siendo la gráfica que caracteriza la anterior ecuación:



Al tabular los datos de la gráfica se tiene:

Tiempo.	Absorbancia
t_1	Abs_1
t_2	Abs_2
t_3	Abs_3
.	.
.	.
t_n	Abs_n
.	.
.	.
t_∞	Abs_∞

Donde se observa que:

$$Abs_1 > Abs_2 > Abs_3 > \dots > Abs_n > \dots = Abs_\infty$$

Al someter los datos tabulados a regresión y correlación exponencial, serán caracterizadas la ordenada al origen (A), el coeficiente de regresión exponencial (a), y el coeficiente de correlación que es una medida de la certeza de la ecuación

para explicar los datos experimentales.

2) Si $v_f > v_d$ para todo tiempo, se sigue la ecuación siguiente:

$$Abs = A - B e^{-bt} \quad \dots(5)$$

Donde un gráfico que representa la ecuación anterior es:



Al tabular los datos de este gráfico:

Tiempo Absorbancia

t_1	Abs_1
t_2	Abs_2
t_3	Abs_3
.	.
.	.
t_n	$Abs_{m\acute{a}x}$
.	.
.	.
t_{∞}	$Abs_{m\acute{a}x}$

En que:

$$Abs_1 < Abs_2 < Abs_3 < \dots = Abs_{m\acute{a}x} = \dots = Abs_{m\acute{a}x}$$

Para caracterizar las constantes de la ecuación (5), la absorbancia máxima registrada ($Abs_{m\acute{a}x}$) es "A", mientras que para determinar b y "B" es necesario aplicar el método de la residual, lo que consiste en efectuar los siguientes cálculos y tabularlos de la siguiente manera:

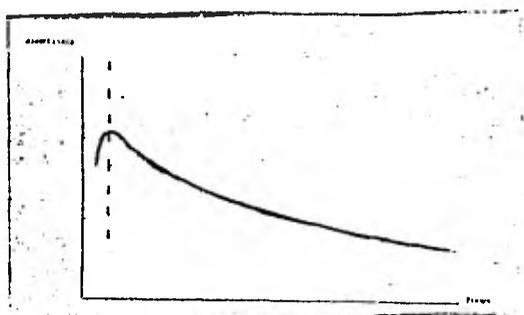
Tiempo	Absorbancia
t_1	$Abs_{m\acute{a}x} - A_1$
t_2	$Abs_{m\acute{a}x} - A_2$
t_3	$Abs_{m\acute{a}x} - A_3$
.	.
.	.
.	.
t_{n-1}	$Abs_{m\acute{a}x} - A_{n-1}$

Al someter las diferencias o residuales (de aquí su nominación) a regresión y correlación exponencial, se obtendrán el valor de las constantes "b" y "B", además de indicar la veracidad de la ecuación para explicar los datos experimentales por el coeficiente de correlación.

3) Si V_f , V_d , V_f , V_d , V_f , V_d a través del tiempo (en ese orden) se cumple la siguiente ecuación:

$$\text{Abs} = A e^{-at} - B e^{-bt} \quad \dots\dots(3)$$

Por lo que una gráfica que describe a la ecuación anterior es:



La que es dividida en 2 partes (línea punteada) para poder caracterizar las constantes de la ecuación en la fase de destrucción del complejo (a la derecha de la línea punteada) y la fase de formación del complejo (a la izquierda de la línea punteada).

Al tabular los datos de la fase de destrucción del complejo se tiene:

Tiempo	Absorbancia
$t_{\text{máx}}$	$\text{Abs}_{\text{máx}}$
$t_{\text{máx}+1}$	$\text{Abs}_{\text{máx}+1}$
$t_{\text{máx}+2}$	$\text{Abs}_{\text{máx}+2}$
.	.
$t_{\text{máx} n}$	$\text{Abs}_{\text{máx} n}$
.	.
t	Abs

Sometiendo estos datos a regresión y correlación exponencial se caracterizan las constantes "a" y "A" así como el coeficiente de correlación para la fase de destrucción del complejo.

Ya caracterizada la ecuación para la fase de destrucción del complejo se obtienen las residuales respectivas, las que se tabulan de la forma siguiente:

Tiempo Absorbancia

$$t_1 \quad A e^{-at_1} - Abs_1$$

$$t_2 \quad A e^{-at_2} - Abs_2$$

$$t_3 \quad A e^{-at_3} - Abs_3$$

⋮
⋮
⋮

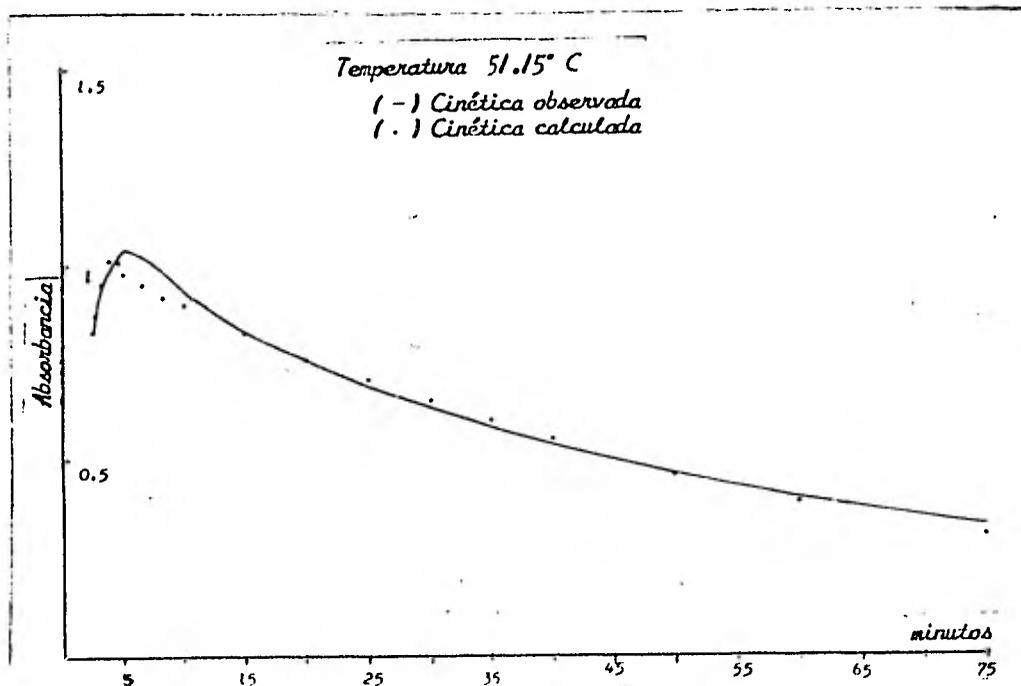
$$t_{máx-1} \quad A e^{-at_{máx-1}} - Abs_{máx-1}$$

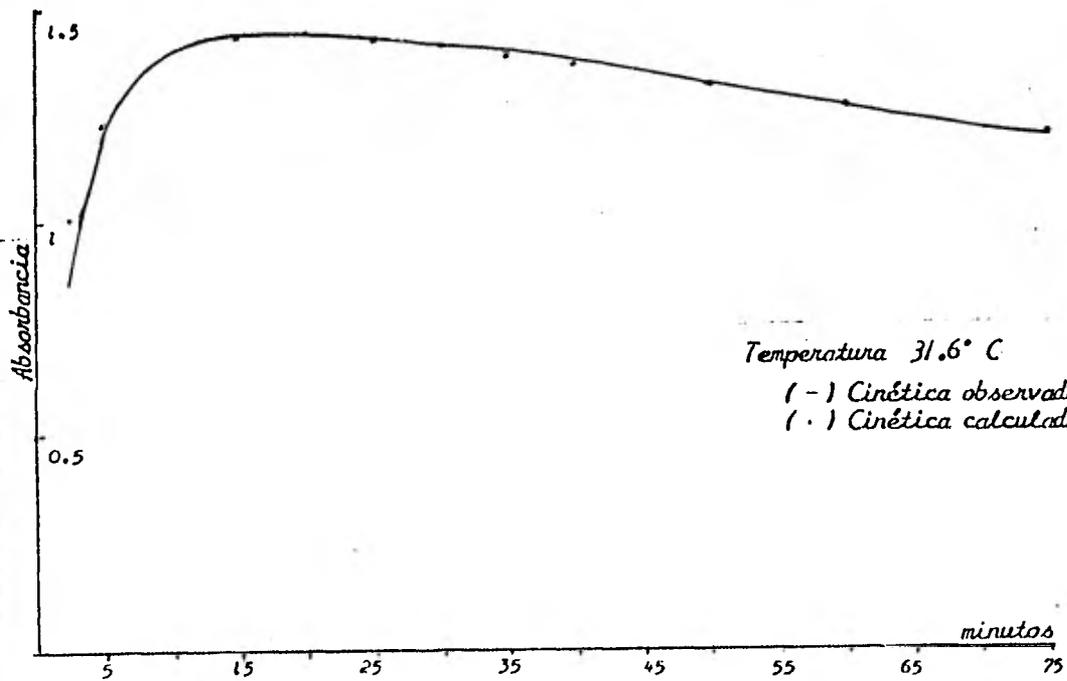
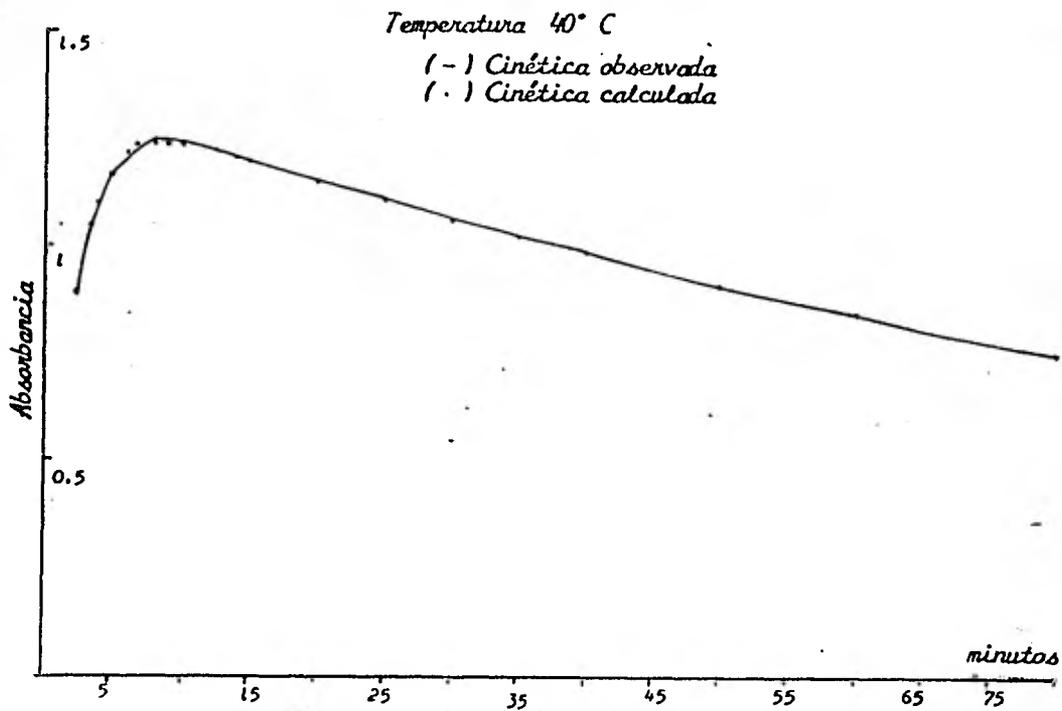
Y al aplicarles a estos datos regresión y correlación exponencial el valor de las constantes "B" y "b" son encontrados además de el coeficiente de correlación para la ecuación de la fase de destrucción del complejo.

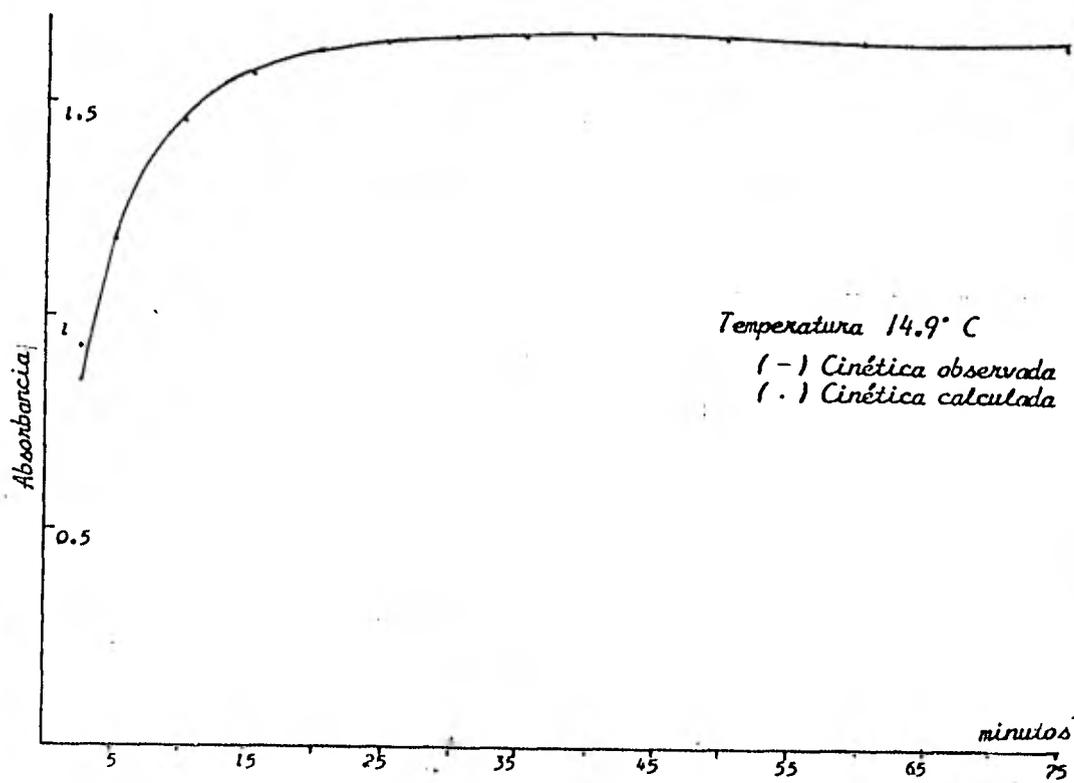
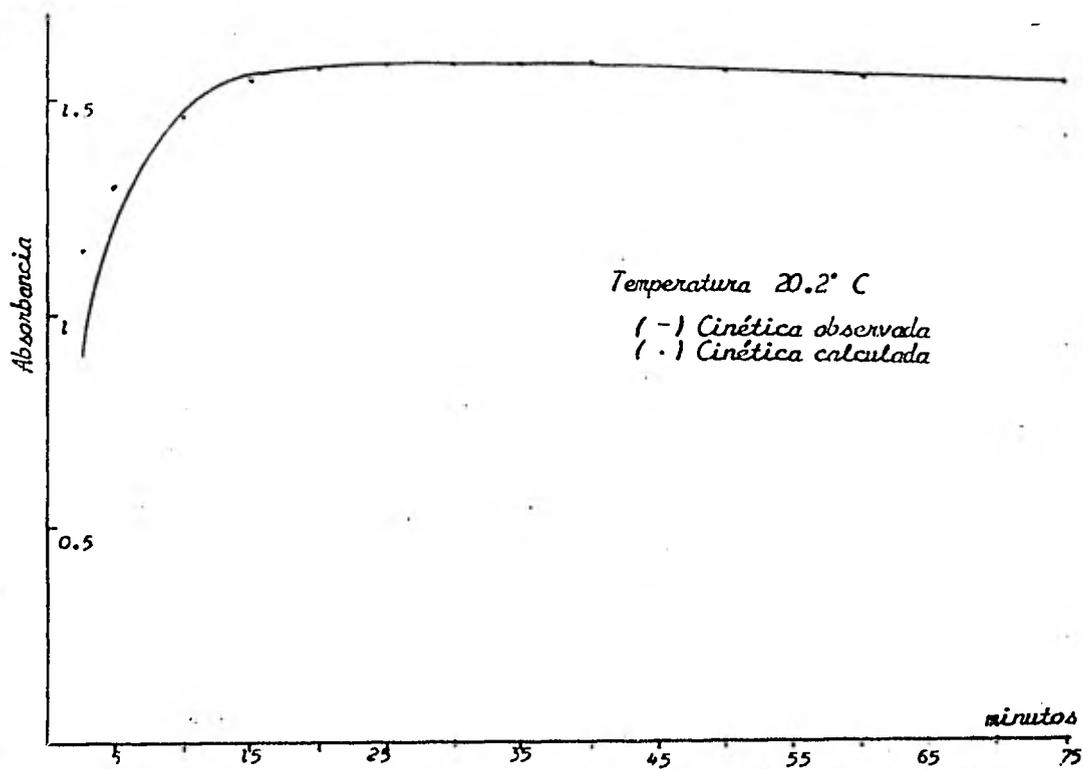
En función de lo antes explicado se obtuvieron las ecuaciones o curvas de regresión (Tabla 5) para la cinética del complejo a las temperaturas experimentadas. En esta se observa una correlación aceptable entre la ecuación y los datos experimentales de la variable de respuesta (absorbancia del complejo), lo que puede apreciarse mejor en las gráficas siguientes las que permiten comparar visualmente la predicción de la variable de respuesta utilizando la ecuación de regresión respectiva (cinética calculada) con el registro de la variable de respuesta observada (cinética observada).

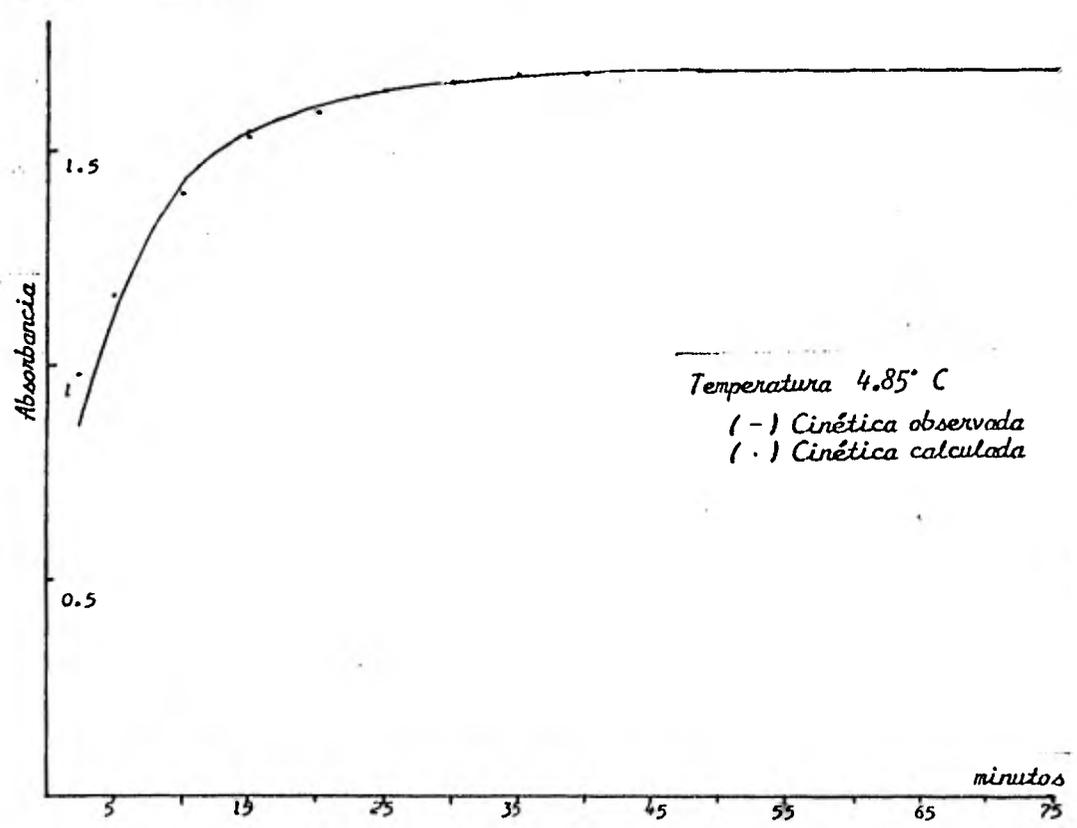
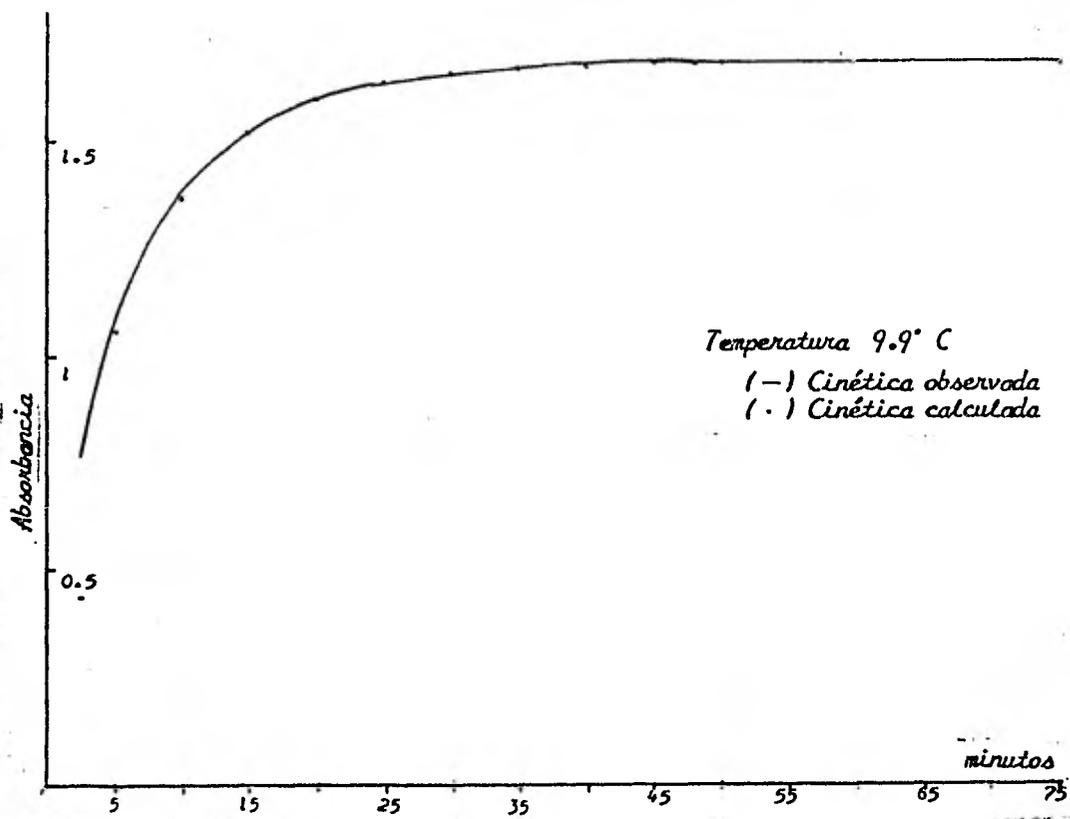
Temperatura	Absorción del Complejo Nerifalina-Picrato en función del tiempo (seg)		Coeficiente de Correlación	
			Destrucción	Formación
51.15° C	$1.0689 e^{-280.1860 (10^{-6} \pm)}$	$- 11.6150 e^{-26.9750 (10^{-3} \pm)}$	$992.766 (10^{-3})$	$991.334 (10^{-3})$
40.00° C	$1.3520 e^{-131.776 (10^{-6} \pm)}$	$- 1.7029 e^{-8.7814 (10^{-3} \pm)}$	$999.780 (10^{-3})$	$998.734 (10^{-3})$
31.60° C	$1.5870 e^{-64.0891 (10^{-6} \pm)}$	$- 0.7452 e^{-2.6755 (10^{-3} \pm)}$	$997.524 (10^{-3})$	$990.442 (10^{-3})$
20.20° C	$1.6396 e^{-15.8454 (10^{-6} \pm)}$	$- 0.6954 e^{-2.4607 (10^{-3} \pm)}$	$990.488 (10^{-3})$	$988.186 (10^{-3})$
14.90° C	$1.6811 e^{-6.4707 (10^{-6} \pm)}$	$- 1.1127 e^{-2.6541 (10^{-3} \pm)}$	$961.444 (10^{-3})$	$994.324 (10^{-3})$
9.90° C	$1.6790 + 1.2434 e^{-2.3032 (10^{-3} \pm)}$		000.000	$995.305 (10^{-3})$
4.85° C	$1.6910 - 0.95917 e^{-1.9645 (10^{-3} \pm)}$		000.000	$996.770 (10^{-3})$

Tabla 5. Curvas de Regresión Exponencial para la Cinética de Absorbancia del Complejo Nerifalina-Picrato a 492 nm.









De los modelos propuestos para predecir la absorbancia del complejo en función del tiempo (1), (2), en el Modelo I las exponenciales son multiplicadas por un mismo coeficiente, lo que permite indicar que el equilibrio entre el etóxido y la nerifolina para dar el anión furfílico no se alcanza en las condiciones experimentadas ya que en todas las ecuaciones encontradas existen diferencias en los coeficientes, es el Modelo II el que explica las diferencias en los coeficientes lo que sugiere su posible validez aunque para su comprobación total son necesarios los estudios cinéticos en función de reactivos y solventes, por lo que únicamente el estudio cinético en función de la temperatura permitió discernir ambos modelos en función de los coeficientes mencionados.

El tiempo de lectura de una técnica colorimétrica se define como el tiempo en que se debe de determinar la absorbancia del compuesto colorido después de la adición de un reactivo (o reactivos) a la solución de la molécula que da lugar a este bajo las condiciones de trabajo. Para elegir el tiempo de lectura en un desarrollo colorimétrico se debe de llegar a satisfacer 2 condiciones simultáneamente, de ser posible:

- i) La absorbancia del compuesto colorido debe de ser máxima.
- ii) El cambio de la absorbancia en el tiempo debe de ser mínima.

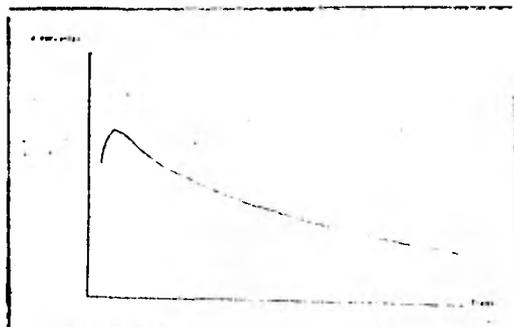
Donde lo anterior sugiere un intervalo de tiempo de lectura, más apropiadamente que un tiempo de lectura.

Al observar las gráficas de la ecuación (3) de la cinética de absorbancia del complejo, únicamente en 2 de ellas se pueden cumplir las 2 condiciones mencionadas:

La siguiente gráfica:

La que es descrita por la ecuación

$$Abs = A e^{-at} - B e^{-bt} \quad \dots(3)$$



La determinación de la primera condición se puede efectuar gráficamente al evaluar el tiempo de absorbancia máxima, o analíticamente obteniendo el máximo de la ecuación (3), lo que consiste en:

$$d(\text{Abs})/dt = b B e^{-bt} - a A e^{-at} \quad \dots\dots(4)$$

$$d(\text{Abs})/dt = 0 = b B e^{-bt_{\text{máx}}} - a A e^{-at_{\text{máx}}} \quad \dots\dots(5)$$

$$t_{\text{máx}} = ((\ln b + \ln B - (\ln a + \ln A))/(b - a)) \quad \dots\dots(6)$$

Y con la fórmula anterior se determina el tiempo de absorbancia máxima analíticamente, lo que tiene asociado un valor de absorbancia máxima ($\text{Abs}_{\text{máx}}$).

La segunda condición puede cumplirse al proponerse un valor para el cambio de absorbancia del complejo alrededor de la absorbancia máxima de este; si se propone un error relativo de 0.1% (0.002 de absorbancia) en el cambio, es decir $\text{Abs}_{\text{max}} \pm 0.002$ lo que tiene asociado un intervalo de tiempo (tiempo inferior y tiempo superior), pudiéndose determinar gráficamente o analíticamente mediante métodos iterativos, ya que las ecuaciones:

$$\text{Abs}_{\text{max}} + 0.002 = A e^{-at_{\text{sup.}}} - B e^{-bt_{\text{sup.}}} \quad \dots\dots(7)$$

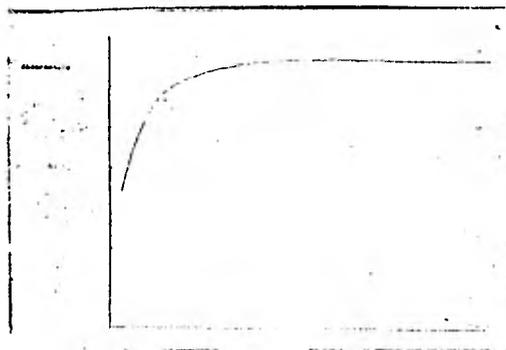
$$\text{Abs}_{\text{máx}} - 0.002 = A e^{-at_{\text{inf.}}} - B e^{-bt_{\text{inf.}}} \quad \dots\dots(8)$$

No pueden ser resueltas analíticamente para el tiempo.

La siguiente gráfica:

La que es descrita por la ecuación:

$$\text{Abs} = A - B e^{-bt} \quad \dots\dots(5)$$



La máxima absorbancia en la ecuación anterior tanto gráficamente como analíticamente corresponde al valor de la constante "A", debido a que es la asíntota vertical de la gráfica, por lo que:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \text{Abs}_{\text{máx}} = A - B e^{-bt} = A - 0 \quad \dots(9)$$

De donde se llega a:

$$\text{Abs}_{\text{máx}} = A \quad \dots(10)$$

Y esto ocurre gráficamente en un intervalo de tiempo a partir del momento en que se llega a ese valor de absorbancia, mientras que analíticamente depende del valor mínimo de la escala del aparato (espectrofotómetro).

La segunda condición podrá cumplirse en forma semejante al caso anterior, por lo que el intervalo de tiempo de lectura gráficamente tiene como valor inferior a el valor asociado de $A - 0.002$, y para determinarle analíticamente se plantea:

$$A - 0.002 = A - B e^{-bt_{\text{inf}}} \quad \dots(11)$$

Llegando a:

$$t_{\text{inf}} = (\ln B + 6.21461) / b \quad \dots(12)$$

Siendo el valor superior de intervalo para ambos métodos (gráfico y analítico), el tiempo que dura la experiencia.

En base a lo anterior se determinó gráficamente y analíticamente el intervalo de tiempo de lectura asociado a cada temperatura experimentada (Tabla 6), lo que permitió elegir como temperatura de

ANALITICAMENTE

Temperatura	Intervalo de Tiempo de lectura (min)	Porcentaje de Error Relativo en la lectura
31.60° C	[16.5 a 21.5]	0.15
20.20° C	[24.5 a 34.0]	0.10
14.90° C	[29.5 a 44.0]	0.10
9.90° C	[47.0 a 75.0]	0.10
4.85° C	[53.0 a 75.0]	0.10

GRAFICAMENTE

Temperatura	Intervalo de Tiempo de lectura (min)	Porcentaje de Error Relativo en la lectura
31.60° C	[14.0 a 24.0]	0.15
20.20° C	[20.5 a 38.0]	0.10
14.90° C	[31.0 a 48.0]	0.10
9.90° C	[43.0 a 75.0]	0.10
4.85° C	[48.0 a 75.0]	0.10

Tabla 6. Intervalo de Tiempo de Lectura de Absorbancia para el Complejo Nerifolina-Picrato a 492 nm.

incubación del complejo (T_i) a una temperatura aproximada de 10° C, usando como criterio de elección los datos suscritos en la siguiente table:

Temperatura de Incubación (° C)	Eficiencia Relativa del Intervalo de Tiempo de lectura (%)	
	Análítica	Gráfica
20.20	12.67	23.33
14.90	19.33	22.67
9.90	37.33	42.67
4.85	29.33	36.00

En que el porciento de eficiencia relativa del intervalo de tiempo de lectura se definió como el porciento de la razón, de la diferencia en segundos del Límite Superior con el Límite Inferior y el tiempo total en segundos que dura la experiencia de la cinética de absorción del complejo $((t_{sup} - t_{inf})/4500)\%$, lo cual ocurre tanto gráficamente como analíticamente a 9.9° C.

Ya caracterizada esta variable independiente (T_i) en 10° C, es de esperarse que al retirar la solución a determinarle su absorbancia del baño de incubación, los parámetros cinéticos del sistema cambien debido a la variación de la temperatura en el sistema, lo que hace aumentar el error sistemático en las lecturas, ocurriendo esto frecuentemente ya que la mayoría de los aparatos de medición no poseen integrado un baño termostático.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-Se agregó a 3 celdas del espectrofotómetro lo que indica la siguiente tabla:(2 celdas para B):

Celda	A	B	
	0.9 ml	-	Disolución Estándar "D" de Nerifolina
	-	0.9 ml	Etol
	0.6 ml	0.6 ml	Hidróxido de Sodio al 0.8%
	1.5 ml	1.5 ml	Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%

-Se agito por inversión, se registró en el graficador además de anotar las lecturas de absorbancia del complejo a 536 nanómetros hasta un tiempo de 75 minutos, a una temperatura cercana a los 50° C utilizando a B como referencia.

-Se repitió la experiencia utilizando temperaturas cercanas a 40° C, 30° C, 20° C, 15° C, 10° C, y 5° C.

Resultados:

\bar{T} 50.95		\bar{T} 50.95		\bar{T} 50.95	
tiempo (seg)	lectura (Abs)	tiempo (seg)	lectura (Abs)	tiempo (seg)	lectura (Abs)
150	0.575	780	0.187	1440	0.095
180	0.503	810	0.181	1470	0.094
210	0.452	840	0.174	1500	0.091
240	0.415	870	0.168	1530	0.089
270	0.386	900	0.162	1560	0.087
300	0.363	930	0.157	1590	0.085
330	0.343	990	0.148	1620	0.083
360	0.324	1020	0.143	1650	0.081
390	0.309	1050	0.139	1680	0.079
420	0.297	1080	0.134	1710	0.077
450	0.284	1110	0.130	1740	0.076
480	0.272	1140	0.126	1770	0.074
510	0.261	1170	0.122	1800	0.073
540	0.252	1200	0.119	1830	0.071
570	0.242	1230	0.116	1860	0.070
600	0.233	1260	0.112		
630	0.224	1290	0.109		
660	0.216	1320	0.106		
690	0.208	1350	0.103		
720	0.201	1380	0.101		
750	0.193	1410	0.098		

\bar{T} es el promedio de las temperaturas registradas al inicio y al final del experimento.

\bar{T} 40.4 \bar{T} 40.4 \bar{T} 31.2

tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)
150	0.689	1650	0.268	150	0.878
180	0.666	1680	0.264	180	0.924
210	0.652	1710	0.259	210	0.939
240	0.627	1740	0.255	240	0.945
270	0.610	1770	0.251	270	0.947
300	0.594	1800	0.247	300	0.942
330	0.582	1860	0.239	330	0.937
360	0.568	1920	0.232	360	0.931
390	0.556	1980	0.225	390	0.925
420	0.542	2040	0.218	420	0.917
450	0.532	2100	0.211	450	0.909
480	0.521	2160	0.204	480	0.902
510	0.510	2220	0.198	510	0.895
540	0.500	2280	0.192	540	0.887
570	0.491	2340	0.187	570	0.879
600	0.483	2400	0.181	600	0.871
630	0.475	2460	0.175	630	0.863
660	0.466	2520	0.171	660	0.855
690	0.458	2580	0.165	690	0.847
720	0.449	2640	0.160	720	0.840
750	0.442	2760	0.151	750	0.833
780	0.434	2880	0.143	780	0.825
810	0.427	3000	0.135	810	0.817
840	0.421	3120	0.127	840	0.810
870	0.413	3240	0.121	870	0.803
900	0.406	3360	0.114	900	0.796
930	0.399	3480	0.108	930	0.789
960	0.392	3600	0.103	960	0.783
990	0.386	3780	0.095	990	0.776
1020	0.379	3990	0.088	1020	0.769
1030	0.373	4140	0.083	1050	0.763
1080	0.367	4320	0.074	1080	0.757
1110	0.360	4500	0.069	1110	0.751
1140	0.356			1140	0.745
1170	0.348			1170	0.738
1200	0.343			1200	0.732
1230	0.338			1230	0.726
1260	0.331			1260	0.720
1290	0.326			1290	0.714
1320	0.321			1320	0.707
1350	0.315			1350	0.701
1380	0.310			1380	0.696
1410	0.305			1410	0.690
1440	0.300			1440	0.684
1470	0.295			1470	0.678
1500	0.291			1500	0.672
1530	0.286			1530	0.666
1560	0.281			1560	0.660
1590	0.276			1590	0.655
1620	0.272				

\bar{T} 31.2 \bar{T} 20.2 \bar{T} 20.2

tiempo (seg)	lectura (Abs)	tiempo (seg)	lectura (Abs)	tiempo (seg)	lectura (Abs)
1620	0.649	150	0.956	1590	1.176
1650	0.643	180	1.008	1620	1.173
1680	0.638	210	1.059	1650	1.170
1710	0.632	240	1.097	1680	1.166
1740	0.627	270	1.126	1710	1.163
1770	0.622	300	1.153	1740	1.160
1800	0.616	330	1.176	1770	1.157
1860	0.605	360	1.196	1800	1.154
1920	0.595	390	1.210	1860	1.148
1980	0.584	420	1.225	1920	1.142
2040	0.574	450	1.236	1980	1.135
2100	0.565	480	1.245	2040	1.129
2160	0.555	510	1.255	2100	1.123
2220	0.545	540	1.262	2160	1.116
2280	0.535	570	1.268	2220	1.109
2340	0.526	600	1.271	2280	1.103
2400	0.517	630	1.277	2340	1.095
2460	0.508	660	1.277	2400	1.088
2520	0.500	690	1.278	2460	1.081
2580	0.491	720	1.281	2520	1.074
2640	0.481	750	1.282	2580	1.065
2760	0.466	780	1.282	2640	1.056
2880	0.449	810	1.282	2760	1.035
3000	0.434	830	1.282	2880	1.011
3120	0.419	870	1.282	3000	0.993
3240	0.405	900	1.279	3120	0.979
3360	0.391	930	1.278	3240	0.970
3480	0.377	960	1.275	3360	0.960
3600	0.364	990	1.274	3480	0.951
3780	0.346	1020	1.271	3600	0.941
3920	0.328	1050	1.267	3780	0.923
4140	0.312	1080	1.266		
4320	0.296	1110	1.261		
4560	0.279	1140	1.257		
		1170	1.251		
		1200	1.246		
		1230	1.240		
		1260	1.233		
		1290	1.228		
		1320	1.222		
		1350	1.215		
		1380	1.209		
		1410	1.204		
		1440	1.198		
		1470	1.193		
		1500	1.188		
		1530	1.184		
		1560	1.179		

\bar{T} 14.4 \bar{T} 14.4 \bar{T} 10.3

tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)	tiempo (seg)	Lectura (Abs)
150	0.960	1620	1.467	150	1.000
180	1.027	1650	1.466	210	1.141
210	1.081	1680	1.465	240	1.195
240	1.126	1710	1.464	270	1.245
270	1.164	1740	1.463	300	1.286
300	1.201	1770	1.460	330	1.316
330	1.229	1800	1.459	360	1.347
360	1.258	1860	1.455	390	1.381
390	1.283	1920	1.451	420	1.408
420	1.303	1980	1.448	450	1.431
450	1.324	2040	1.445	480	1.455
480	1.339	2100	1.440	510	1.475
510	1.357	2160	1.437	540	1.493
540	1.371	2220	1.432	570	1.510
570	1.383	2280	1.428	600	1.525
600	1.393	2340	1.424	630	1.540
630	1.403	2400	1.420	660	1.554
660	1.412	2460	1.416	690	1.567
690	1.423	2520	1.412	720	1.575
720	1.429	2580	1.408	780	1.595
750	1.436	2640	1.403	810	1.605
780	1.441	2760	1.395	840	1.613
810	1.447	2880	1.387	870	1.620
840	1.452	3000	1.377	900	1.627
870	1.456	3120	1.369	930	1.634
900	1.460	3240	1.360	960	1.640
930	1.464	3360	1.353	990	1.645
960	1.466	3480	1.341	1020	1.649
990	1.468	3600	1.332	1050	1.654
1020	1.471	3720	1.323	1080	1.657
1050	1.472	3840	1.313	1110	1.661
1080	1.473	4020	1.299	1140	1.666
1110	1.475	4200	1.284	1170	1.669
1140	1.475	4380	1.270	1200	1.671
1170	1.475	4560	1.255	1230	1.673
1200	1.476			1260	1.678
1230	1.476			1290	1.679
1260	1.476			1320	1.681
1290	1.477			1350	1.683
1330	1.477			1380	1.684
1350	1.476			1410	1.686
1380	1.475			1440	1.687
1410	1.475			1470	1.688
1440	1.475			1500	1.689
1470	1.475			1530	1.690
1500	1.473			1560	1.691
1530	1.473			1590	1.690
1560	1.471			1620	1.691
1590	1.469			1650	1.691

\bar{T} 10.3 \bar{T} 5.9 \bar{T} 5.9

tiempo (seg) lectura (Abs)

1680 1.691
 1710 1.691
 1740 1.691
 1770 1.691
 1800 1.691
 1830 1.691
 1860 1.691
 1920 1.689
 1980 1.688
 2040 1.685
 2100 1.684
 2160 1.682
 2220 1.680
 2280 1.678
 2340 1.675
 2400 1.672
 2460 1.669
 2520 1.666
 2580 1.663
 2640 1.660
 2760 1.654
 2880 1.647
 3000 1.640
 3120 1.633
 3240 1.625
 3360 1.616
 3480 1.608
 3600 1.599
 3780 1.585
 3990 1.572
 4140 1.558
 4320 1.684
 4500 1.525

tiempo (seg) lectura (Abs)

150 0.992
 180 1.070
 210 1.132
 240 1.185
 270 1.231
 300 1.276
 330 1.317
 360 1.349
 390 1.377
 420 1.403
 450 1.428
 480 1.450
 510 1.470
 540 1.489
 570 1.505
 600 1.523
 630 1.536
 660 1.549
 690 1.563
 720 1.576
 750 1.587
 780 1.594
 810 1.605
 840 1.613
 870 1.620
 900 1.631
 930 1.637
 960 1.643
 990 1.650
 1020 1.656
 1050 1.662
 1080 1.669
 1110 1.672
 1140 1.674
 1170 1.680
 1200 1.685
 1230 1.690
 1260 1.693
 1290 1.695
 1320 1.699
 1350 1.703
 1380 1.705
 1410 1.706
 1440 1.708
 1470 1.711
 1500 1.714
 1530 1.716
 1560 1.718
 1590 1.720
 1620 1.721
 1650 1.722

tiempo (seg) lectura (Abs)

1680 1.723
 1710 1.724
 1740 1.725
 1770 1.727
 1800 1.728
 1830 1.728
 1860 1.728
 1890 1.729
 1920 1.730
 1950 1.731
 1980 1.732
 2010 1.732
 2040 1.732
 2070 1.732
 2100 1.732
 2130 1.732
 2160 1.732
 2190 1.732
 2220 1.732
 2250 1.732
 2280 1.732
 2310 1.732
 2340 1.732
 2370 1.732
 2400 1.732
 2430 1.731
 2460 1.730
 2490 1.729
 2520 1.729
 2580 1.729
 2640 1.728
 2700 1.726
 2760 1.724
 2820 1.722
 2880 1.720
 3000 1.716
 3120 1.712
 3360 1.702
 3480 1.696
 3600 1.694
 3780 1.687
 3960 1.676
 4140 1.665
 4320 1.657
 4500 1.648

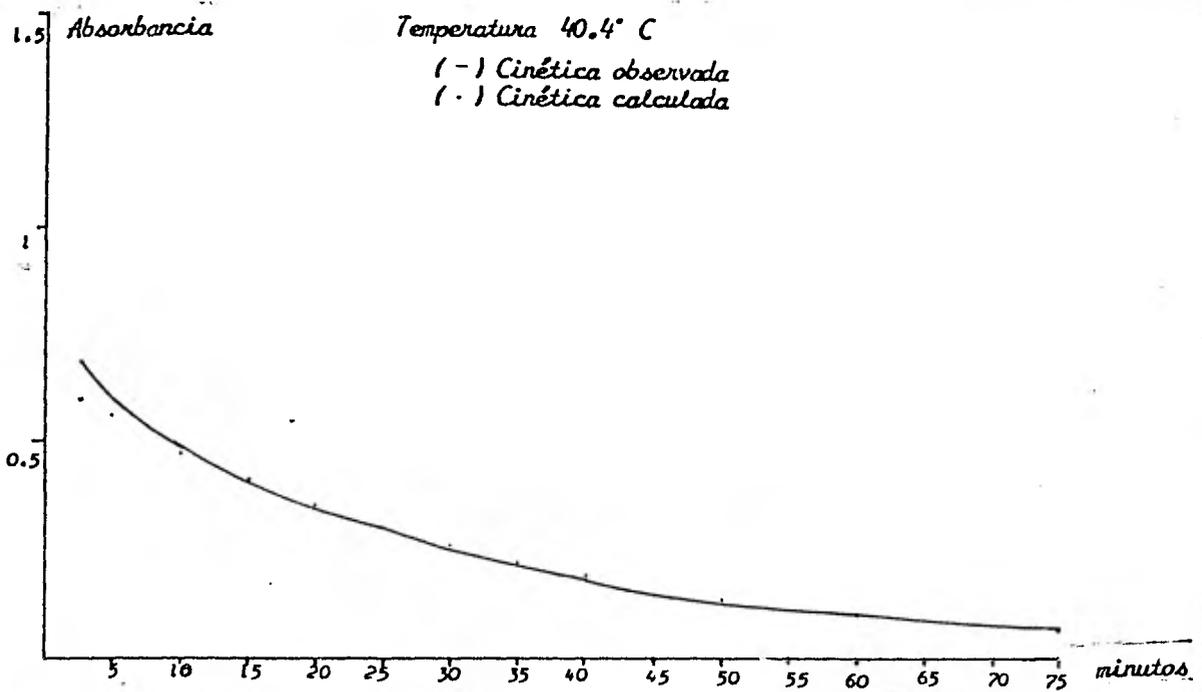
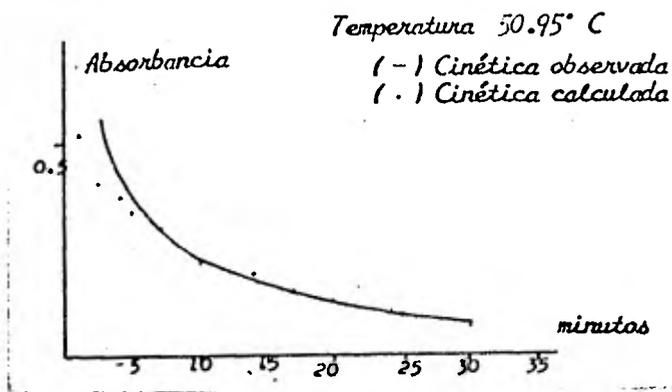
Discusiones:

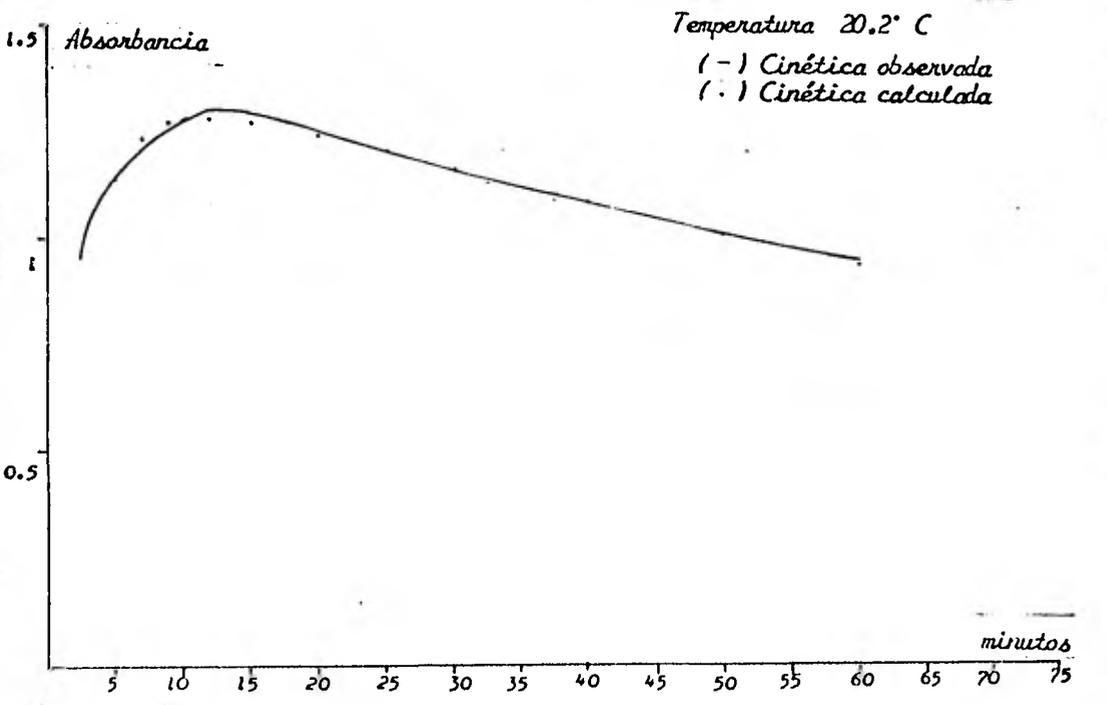
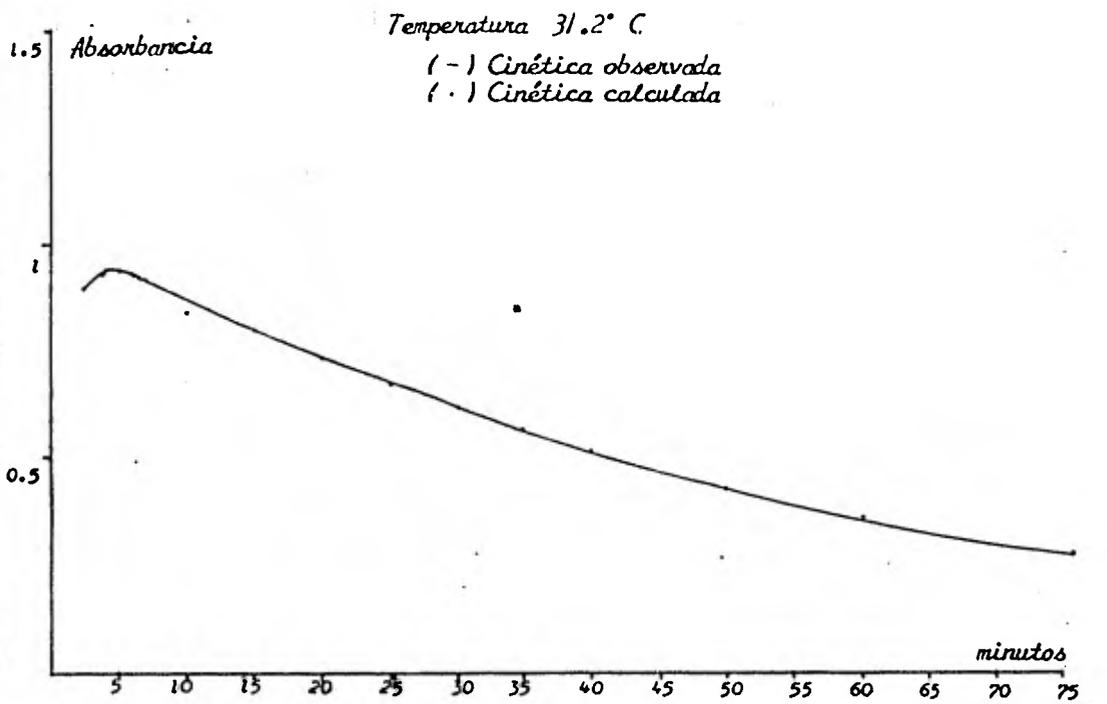
Con los datos anteriores se obtuvieron las ecuaciones o curvas de regresión (Tabla 6) para la cinética del complejo a las temperaturas experimentadas.

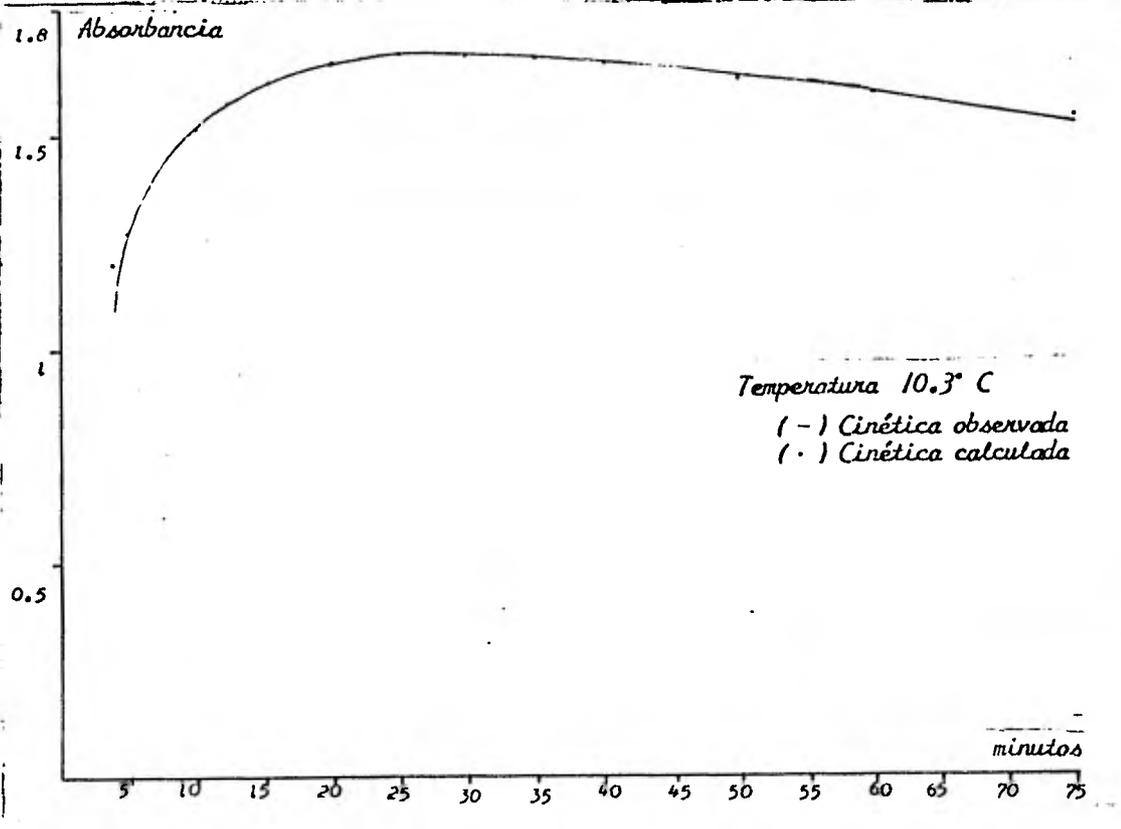
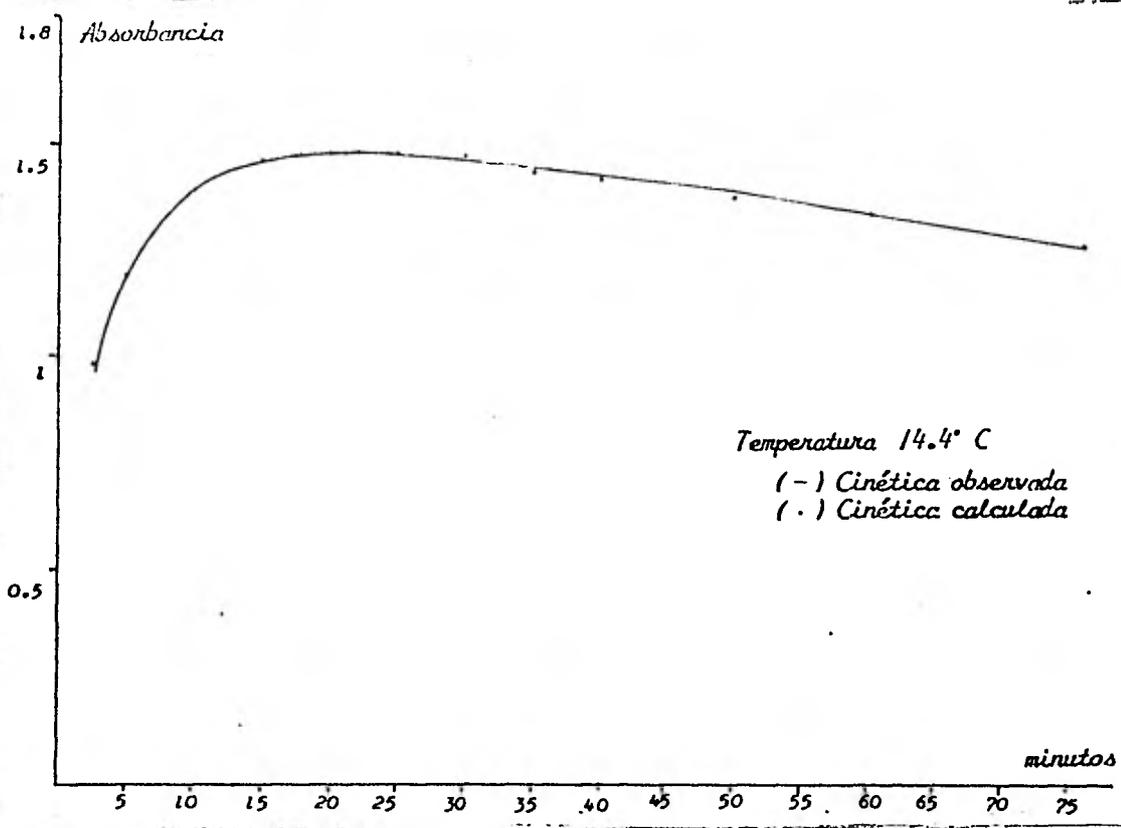
Temperatura	Absorción del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato en función del tiempo (seg)	Coeficiente de Correlación	
		Destrucción	Formación
50.95° C	$0.4807 e^{-111.3390 (10^{-5} t)}$	$987.845 (10^{-3})$	-
40.40° C	$0.6536 e^{-52.3708 (10^{-5} t)}$	$995.083 (10^{-3})$	-
31.20° C	$1.0356 e^{-28.9623 (10^{-5} t)} - 1.4521 e^{-117.9122 (10^{-3} t)}$	$999.961 (10^{-3})$	$997.248 (10^{-3})$
20.20° C	$1.4280 e^{-11.6700 (10^{-5} t)} - 1.2547 e^{-5.9368 (10^{-3} t)}$	$986.743 (10^{-3})$	$984.248 (10^{-3})$
14.40° C	$1.5930 e^{-4.9811 (10^{-5} t)} - 0.9434 e^{-3.1252 (10^{-3} t)}$	$994.743 (10^{-3})$	$999.530 (10^{-3})$
10.30° C	$1.8291 e^{-3.8045 (10^{-5} t)} - 1.0270 e^{-2.2576 (10^{-3} t)}$	$989.017 (10^{-3})$	$999.004 (10^{-3})$
5.90° C	$1.8354 e^{-2.3077 (10^{-5} t)} - 1.0177 e^{-1.9862 (10^{-3} t)}$	$990.814 (10^{-3})$	$995.842 (10^{-3})$

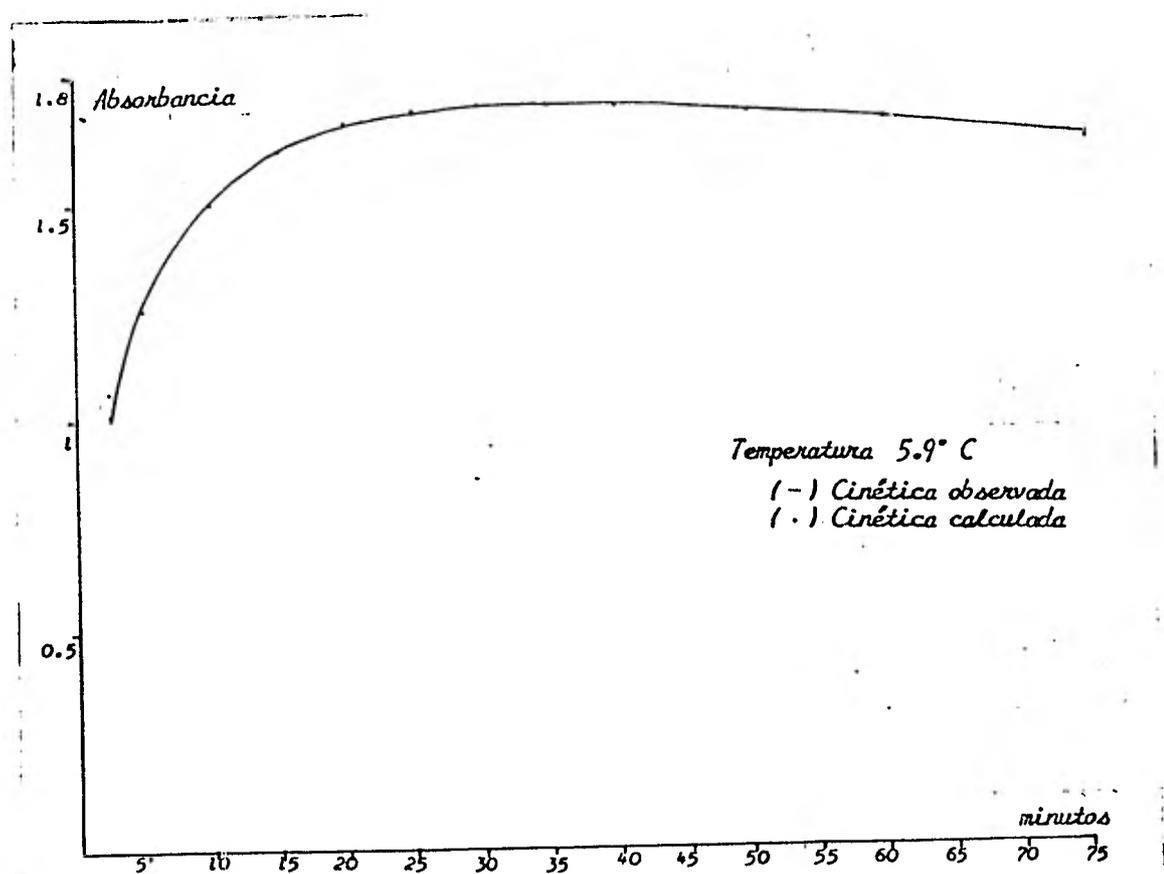
Tabla 6. Curvas de Regresión Exponencial para la Cinética de Absorbancia del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 536 nm.

En esta se puede observar una correlación adecuada a la ecuación para explicar los datos observados, siendo esto mejor apreciado en las siguientes gráficas en las que se representa a la cinética observada (absorbancia registrada) y a la cinética calculada (absorbancia calculada a partir de la ecuación respectiva) a cada temperatura ensayada.









La determinación del intervalo de tiempo de lectura (Tabla 7) para este complejo en el que a las temperaturas experimentadas siempre existe una fase de destrucción, se encontró que una ecuación lineal para esta fase ($\lambda - at$) de una mejor correlación para las variables (Tabla 8), por lo que para determinar analíticamente el tiempo de absorbancia máxima a partir de la ecuación:

$$\text{Abs} = \lambda - ct - B e^{-bt} \quad \dots\dots(13)$$

Se tiene que:

ANALITICAMENTE

Temperatura	Intervalo de Tiempo de lectura (seg)	Porcentaje de Error Relativo en la lectura
31.20° C	[230 a 280]	0.10
20.20° C	[620 a 740]	0.10
14.40° C	[1080 a 1350]	0.10
10.30° C	[1410 a 1800]	0.10
5.9° C	[1770 a 2220]	0.10

GRAFICAMENTE

Temperatura	Intervalo de Tiempo de lectura (seg)	Porcentaje de Error Relativo en la lectura
31.20° C	[240 a 270]	0.10
20.20° C	[720 a 900]	0.10
14.40° C	[1110 a 1470]	0.10
10.30° C	[1500 a 1920]	0.10
5.9° C	[1920 a 2460]	0.10

Tabla 7. Intervalo de Tiempo de Lectura de Absorbancia para el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 536 nm.

Temperatura	Absorbancia del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato en función del tiempo (seg)			
	Modelo Lineal	Correlación	Modelo Exponencial	Correlación
20.20° C	$1.3923 - 128.328(10^{-6}) \pm$	$988.895(10^{-3})$	$1.428 e^{-11.6700(10^{-5}) \pm}$	$986.743(10^{-3})$
14.40° C	$1.5806 - 68.9705(10^{-6}) \pm$	$996.459(10^{-3})$	$1.5930 e^{-4.9811(10^{-5}) \pm}$	$994.790(10^{-3})$
10.30° C	$1.8174 - 61.6094(10^{-6}) \pm$	$990.832(10^{-3})$	$1.8291 e^{-3.8045(10^{-5}) \pm}$	$989.017(10^{-3})$
5.90° C	$1.8302 - 39.1322(10^{-6}) \pm$	$991.560(10^{-3})$	$1.8354 e^{-2.3077(10^{-5}) \pm}$	$990.814(10^{-3})$

Tabla 8. Ecuaciones y Coeficientes para la Regresión y Correlación Lineal y Exponencial para la Destrucción del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato.

$$d(\text{Abs})/dt = 0 = B b e^{-bt_{\text{m}\acute{e}x}} - a \quad \dots\dots(14)$$

$$t_{\text{m}\acute{e}x} = \ln (b B/ a)/b \quad \dots\dots(15)$$

Y dado un error relativo de 0.1% en el cambio de absorbancia, esto da lugar:

$$\text{Abs}_{\text{m}\acute{e}x} - 0.002 = \lambda - at_{\text{inf}} - B e^{-bt_{\text{inf}}} \quad \dots\dots(16)$$

$$\text{Abs}_{\text{m}\acute{e}x} + 0.002 = \lambda - at_{\text{sup}} - B e^{-bt_{\text{sup}}} \quad \dots\dots(17)$$

Y por lo tanto el intervalo de tiempo de lectura debe de ser resuelto mediante métodos iterativos, ya que t_{inf} y t_{sup} no pueden ser resueltos en las ecuaciones (16) y (17) respectivamente.

Con ayuda de la Tabla 8 se construyó la siguiente tabla:

<i>Temperatura de Incubación (°C)</i>	<i>Eficiencia Relativa del Intervalo de Tiempo de Lectura%</i>	
	<i>Análítica</i>	<i>Gráfica</i>
31.20	1.11	0.67
20.20	2.67	4.00
14.40	6.00	8.00
10.30	8.67	9.33
5.90	10.00	12.00

En la que se observa que el máximo del porciento de eficiencia relativa del intervalo de tiempo de lectura se localiza en 5.9° C, pero debido a la condensación de la humedad atmosférica en el exterior de las celdas de lectura, dicha temperatura se elimino como temperatura de incubación del complejo (T_i) eligiendo a las temperaturas con canas a los 10 ° C y 15° C, debido a los valores encontrados del criterio de elección.

EXPERIMENTO VI

Nombre: Cinética Bitérmica del Complejo de Meisenheimer

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-En 2 tubos de ensayo cubiertos de la luz, se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubo	A	B	
	3 ml	-	Solución Estándar "C" de Nerifolina
	-	3 ml	Etanol
	3 ml	3 ml	Reactivo Alcalino de Picrato

-Se agitó mecánicamente, se dejó reposar en un baño de 10° C durante 40 minutos, se registró la absorbancia a 492 nanómetros del contenido del tubo A utilizando como solución de referencia al contenido del tubo B cada 30 segundos hasta completar 5 minutos, 2½ minutos después de haber retirado del baño al contenido de los tubos, siendo la temperatura dentro del espectrofotómetro lo más cercano a 20° C.

-Se repitió el experimento variando únicamente el tiempo de estancia en el baño de incubación en 43, 45, y 47 minutos.

Resultados:

Temperatura del Baño de Incubación 10° C

Tiempo de Estancia en el Baño 40 minutos

Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 20.15° C *

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.678
60	1.675
90	1.672
120	1.669

* El promedio de la temperatura inicial y final de la experiencia.

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
150	1.667
180	1.663
210	1.657
240	1.655
270	1.653
300	1.650

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
 Tiempo de Estancia en el Baño 43 minutos
 Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 20.2° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.660
60	1.656
90	1.663
120	1.660
150	1.659
180	1.655
210	1.652
240	1.649
270	1.645
300	1.642

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
 Tiempo de Estancia en el Baño 45 minutos
 Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 19.85° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.623
60	1.619
90	1.617
120	1.614
150	1.612
180	1.611
210	1.608
240	1.607
270	1.604
300	1.602

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
 Tiempo de Estancia en el Baño 47 minutos
 Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 19.9° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.683
60	1.680
90	1.676
120	1.673
150	1.670
180	1.667
210	1.665
240	1.663
270	1.659
300	1.656

Discusiones:

Con los datos encontrados se construyó la siguiente tabla:

	Tiempo de Estancia en el Baño			
	40	43	45	47
Temperatura dentro del espectrofotómetro (°C)	20.15	20.20	19.85	19.90
Coefficiente de Regresión Lineal (Abs / seg)	-1.073 (10 ⁻⁴)	-9.859 (10 ⁻⁵)	-7.333 (10 ⁻⁵)	-9.737 (10 ⁻⁵)
Coefficiente de Coorrelación	995.08 (10 ⁻³)	997.00 (10 ⁻³)	994.04 (10 ⁻³)	997.46 (10 ⁻³)
Por ciento de Error Relativo en la lectura de absorción por minuto	0.322	0.296	0.220	0.292

La que indica que el valor del % de error relativo en la lectura de absorbancia por minuto es mínimo cuando el tiempo de desarrollo del complejo es de 45 minutos (t_d).

Este error relativo se define como la razón del valor absoluto del cambio en la variable de respuesta y un valor constante relacionada con dicha variable, para este caso la variable de respuesta es I

absorbancia del complejo y el valor constante relacionado con la variable de respuesta puede ser la longitud de la escala del aparato de medición, que en este caso es 2 por lo que:

$$\% ER = (\Delta \text{Abs} / 2)(100)$$

Cuando se determina la absorbancia en una solución colorida puede existir un cambio de esta en el tiempo (Abs/tiempo), por lo que al multiplicar por la unidad de tiempo dicho cambio, se elimina el concepto de velocidad. Si se determina el cambio de absorbancia en un tiempo dado para la solución colorida y al multiplicar por una unidad de tiempo acordada será posible determinar el porcentaje de error relativo en la lectura de absorbancia existente en la unidad de tiempo acordada.

Ya caracterizadas en función del desarrollo experimental anterior a λ , t_d , y T_i es posible desarrollar una técnica colorimétrica.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-En 2 tubos de ensaye se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubo	A	B	
	0.9 ml	-	Disolución Estándar "D" de Nerifolina
	-	0.9 ml	Etanol
	0.6 ml	0.6 ml	Hidróxido de Sodio al 0.8%
	1.5 ml	1.5 ml	Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%

-Se agitó mecánicamente, se dejó reposar en un baño de incubación de 15° C por 11 minutos, se registró la lectura de absorción del complejo (contenido del Tubo A) utilizando como solución de referencia al contenido del tubo B a 536 nanómetros, cada 30 segundos hasta

los 5 minutos, 2 minutos después de haber retirado del baño el contenido de los tubos. Siendo la temperatura del espectrofotómetro lo más cercano a 20° C.

-Se repitió el experimento variando el tiempo de estancia en el baño de incubación en 13, 15, y 17 minutos.

-Se repitió el experimento cambiando la temperatura del baño de incubación a 10° C además del tiempo de estancia en el baño (10, 12, 14, y 16 minutos).

Resultados:

Temperatura del Baño de Incubación 15° C
Tiempo de Estancia en el Baño 11 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 20.1° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.465
60	1.459
90	1.452
120	1.441
150	1.436
180	1.432
210	1.425
240	1.417
270	1.407
300	1.400

Temperatura del Baño de Incubación 15° C
Tiempo de Estancia en el Baño 13 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 19.95° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.455
60	1.444
90	1.435
120	1.427
150	1.418
180	1.410
210	1.402
240	1.393
270	1.385
300	1.378

Temperatura del Baño de Incubación 15° C
Tiempo de Estancia en el Baño 15 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 10.85° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.459
60	1.448
90	1.438
120	1.428
150	1.418
180	1.409
210	1.399
240	1.390
270	1.381
300	1.372

Temperatura del Baño de Incubación 15° C
Tiempo de Estancia en el Baño 17 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 20.9° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.429
60	1.413
90	1.397
120	1.386
150	1.373
180	1.357
210	1.345
240	1.332
270	1.318
300	1.307

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
Tiempo de Estancia en el Baño 10 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 20.5° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.492
60	1.489
90	1.485
120	1.481
150	1.478
180	1.472
210	1.467
240	1.467
270	1.454
300	1.449

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
Tiempo de Estancia en el Baño 12 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 20.5° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.517
60	1.510
90	1.499
120	1.493
150	1.485
180	1.478
210	1.469
240	1.462
270	1.455
300	1.447

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
Tiempo de Estancia en el Baño 14 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro 19.95° C

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.517
60	1.507
90	1.501
120	1.492
150	1.480
180	1.471
210	1.464
240	1.455
270	1.444
300	1.438

Temperatura del Baño de Incubación 10° C
Tiempo de Estancia en el Baño 16 minutos
Temperatura Promedio dentro del Espectrofotómetro

tiempo (seg)	lectura (absorbancia)
30	1.559
60	1.547
90	1.538
120	1.525
150	1.515
180	1.504
210	1.493
240	1.483
270	1.473
300	1.462

Discusiones:

Con estos datos se construyó la siguiente tabla:

Temperatura de incubación del Complejo 15° C

	11	13	15	17
Tiempo de Estancia en el Baño (min)				
Temperatura dentro del espectrofotómetro (° C)	20.10	19.95	19.85	20.90
Coefficiente de Regresión Lineal (Abs / seg) (10^{-5})	-23.7576	-28.2626	-32.0808	-44.9899
Coefficiente de Correlación (10^{-3})	996.728	999.226	999.611	999.295
Porcentaje de Error Relativo en la lectura de Absorción por minuto.	0.713	0.848	0.962	1.350

Temperatura de incubación del Complejo 10° C

	10	12	14	16
Tiempo de Estancia en el Baño (min)				
Temperatura dentro del espectrofotómetro (° C)	20.50	20.50	19.95	20.00
Coefficiente de Regresión Lineal (Abs / seg) (10^{-5})	-16.0606	-25.8384	-29.7980	-35.8182
Coefficiente de Correlación (10^{-3})	992.342	999.254	998.781	999.735
Porcentaje de Error Relativo en la lectura de Absorción por minuto	0.482	0.775	0.894	1.074

Esta tabla indica que a los valores de (T_i) experimentados a una temperatura cercana a los 20° C dentro del espectrofotómetro el valor mínimo de error relativo en la lectura de absorbancia por minuto ocurre cuando el tiempo de desarrollo del complejo (t_d) es de 10 minutos a una temperatura de incubación (T_i) de 10° C. Por lo tanto ya caracterizadas las variables (λ , t_d , y T_i) se puede plantear el desarrollo de una técnica colorimétrica.

EXPERIMENTO VII

Nombre: Obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el Complejo de Meisenheimer en función del Estudio Cinético

Sistema Nerifolina-Picrato

Desarrollo:

-Se marcaron 20 tubos de ensayo protegidos de la luz (3 con A, 3 con B, 3 con C, 3 con D, 3 con E, y 5 con F) y se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubo	A	B	C	D	E	F	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	-	Solución Estándar "C" de Nerifolina
	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	-	5 ml	Etanol

-Se agregó a los tubos marcados con "A" y a un tubo marcado con "F" 5 ml del Reactivo Alcalino de Picrato, se agitó mecánicamente y se dejó reposar durante 45 minutos en un baño de 10° C.

-Se determino la lectura de absorbancia del contenido de los tubos "A" a 492 nanómetros utilizando como solución de referencia al contenido del tubo "F".

-Se efectuó el mismo procedimiento para el contenido de los tubos B, C, D, y E.

Resultados:

	Concentración de Nerifolina (mg%)				
	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0
lectura	0.344	0.673	1.022	1.358	1.681
(absorbancia)	0.365	0.674	1.022	1.365	1.682
	0.338	0.338	1.021	1.355	1.670

Discusiones:

Al determinar en base a los datos anteriores la Obediencia a la Ley de Lambert-Beer por este complejo, en la misma solución Estándar "C" de Nerifolina empleada en el Experimento IV en función de las variables caracterizadas anteriormente (λ , t_d , T_i) (Tabla 9), se encontró diferencias en las estadísticas de regresión y en el coeficiente de correlación respecto de los datos a 492 nanómetros del Experimento IV.

<i>Coficiente de Correlación</i>	$999.795 (10^{-3})$
<i>Coficiente de Regresión (Abs / mg%)</i>	$278.806 (10^{-3})$
<i>Ordenada al Origen (Abs)</i>	$13.367 (10^{-3})$
<i>Error Típico de Estimación (Abs)</i>	$10.300 (10^{-3})$

Tabla 9. Estadísticas de Regresión y Correlación a la Obediencia de la Ley de Lambert-Beer del Complejo Nerifolina-Picrato a 492 nm en función de su Estudio Cinético.

La diferencia observada en el error típico de estimación muestral ($S_{y \times 492}$ y $S_{y \times 492_d}$) no fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.001$) (Tabla 10) para indicar que la técnica desarrollada tiene mejor precisión, aunque esta última da intervalos de predicción inversa (ejemplo Abs = 1) más pequeños y por ende más precisos.

Resultados:

	Concentración de Nerifolina (mg%)				
	2	6	8	10	12
lectura	0.252	0.771	1.011	1.278	1.539
(absorbancia)	0.251	0.763	1.029	1.272	1.535
	0.257	0.779	1.023	1.280	1.536

Discusiones:

Con estos datos se determinó la obediencia a la Ley de Lambert-Beer por el complejo en la misma Disolución Estándar "F" de Nerifolina empleada en el Experimento IV en base a las variables caracterizadas en el desarrollo experimental (λ , t_d , T_i) (Tabla 14), encontrándose diferencias en las estadísticas de regresión y coeficiente de correlación respecto de los datos a 536 nanómetros del Experimento IV.

<i>Coefficiente de Correlación</i>	$999.922 (10^{-3})$
<i>Coefficiente de Regresión (Abs / mg%)</i>	$128.065 (10^{-3})$
<i>Ordenada al Origen (Abs)</i>	$-1.563 (10^{-3})$
<i>Error Típico de Estimación (Abs)</i>	$6.105 (10^{-3})$

Tabla 14. Estadísticas de Regresión y Correlación a la Obediencia de la Ley de Lambert-Beer del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 536 nm en función de su Estudio Cinético.

La diferencia observada en el error típico de estimación muestral ($S_{yx\ 536}$ y $S_{yx\ 536d}$) no es estadísticamente significativa ($P \leq 0.01$) (Tabla 15) para indicar mejor precisión en la técnica no desarrollada, aceptándose la igualdad de precisiones en ambas técnicas,

	Valor	Grados de libertad	F calculado	F 18, 13; 0.99
S_{yx}^2 492	1.678 (10^{-4})	18	1.582	3.72
S_{yx}^2 492 _d	1.061 (10^{-4})	13		

Tabla 10. Valor calculado del Estadígrafo "F" para

$$H_0: \sigma_{yx}^2 492 = \sigma_{yx}^2 492_d \quad \text{contra}$$

$$H_a: \sigma_{yx}^2 492 > \sigma_{yx}^2 492_d$$

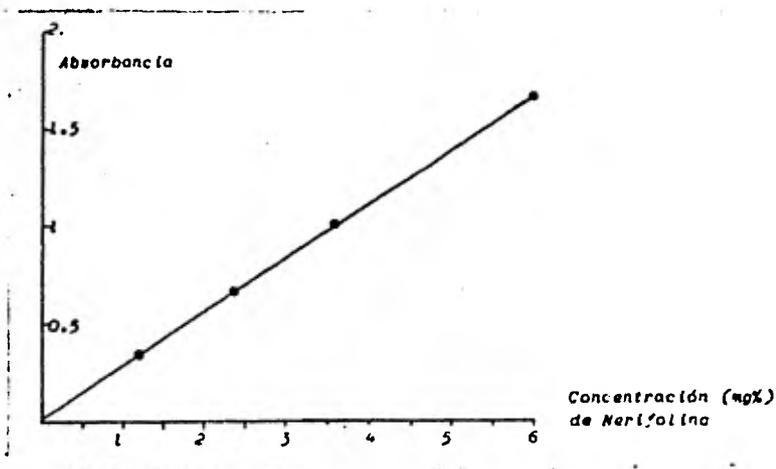
como puede ser demostrado con la siguiente tabla:

Técnica	Error Típico de Estimación Relativo (%)	Estimación del Intervalo (confianza del 99%) para la predicción inversa (Abs=1) (mg%)
492	0.648	3.816 ± 0.15026
492 _d	0.515	3.539 ± 0.11494

Las diferencias observadas con la recta de regresión encontrada (Gráfica 13) presentan significancia estadística ($P < 0.01$) (Tabla 11), lo que es debido a el coeficiente de regresión y ordenada la origen (Tabla 12 y Tabla 13), es decir los datos de este experimento y del Experimento IV no se ajustan a una misma ecuación de regresión.

Esto también puede ser demostrado al dar un intervalo de confianza (99%) para el coeficiente de extinción porcentual ($E_{1\%}^{1\text{ cm}}$) o una estimación puntual de la sensibilidad de ambas técnicas (m/S_{yx}), y un intervalo de confianza (99%) para la ordenada al origen de las ecuaciones de regresión.

Técnica	Intervalo de Confianza (99%) para $E_{1\text{ cm}, 1\%}$	Sensibilidad	Intervalo de Confianza (99%) para la ordenada al origen (b) (Abs):
492	249.379 a 259.205	19.632	0.018 a 0.041
492 _d	274.085 a 283.527	27.068	0.003 a 0.024



Gráfica 13. Recta de Regresión por mínimos cuadrados, a la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-Picrato a 492 nm en función de su Estudio Cinético.

Técnica	$\sum x^2$	$\sum xy$	$\sum y^2$	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	$F_{cal.}$	$F_{2, 31; 0.99}$
492	57.57.6	14.6272	3.72768	$3.01910(10^{-3})$				
492 _d	43.93.2	12.0444	3.35942	$1.37437(10^{-3})$				
				$4.39347(10^{-3})$	31	$1.41725(10^{-4})$		
Dentro	100.8	26.6916	7.08710					
Entre	0.0	-0.0240	0.03025					
Total	100.8	26.6676	7.11735	$6.21824(10^{-2})$	33			
Diferencia				$5.77889(10^{-2})$	2	$2.88945(10^{-2})$	203.88	5.37

Tabla 11. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: b_{492} + m_{492}(N) = b_{492_d} + m_{492_d}(N) \text{ contra}$$

$$H_a: b_{492} + m_{492}(N) \neq b_{492_d} + m_{492_d}(N)$$

Técnica	$\sum x^2$	$\sum xy$	$\sum y^2$	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F _{cal.}	F _{1, 31; 0.99}
492	57.6	14.6272	3.72768	3.01910	(10 ⁻³)			
492 _d	43.2	12.0444	3.35942	1.37437	(10 ⁻³)			
				4.39347	(10 ⁻³)	31	1.41725	(10 ⁻⁴)
Dentro	100.8	26.6916	7.08710	1.92279	(10 ⁻²)	32		
Entre	0.0	-0.0240	0.03025					
Total	100.8	26.6676	7.11735					
Diferencia				1.48344	(10 ⁻²)	1	1.48344	(10 ⁻²)
							104.67	7.54

Tabla 12. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: m_{492} = m_{492_d} \quad \text{contra} \quad H_a: m_{492} \neq m_{492_d}$$

Técnica	$\sum x^2$	$\sum xy$	$\sum y^2$	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F _{cal.}	F _{1, 32; 0.99}
492	57.6	14.6272	3.72768	3.01910	(10 ⁻³)			
492 _d	43.2	12.0444	3.35942	1.37437	(10 ⁻³)			
Dentro	100.8	26.6916	7.08710	1.92279	(10 ⁻²)	32	6.00871	(10 ⁻⁴)
Entre	0.0	-0.0240	0.03025	3.02531	(10 ⁻²)	0		
Total	100.8	26.6676	7.11735	3.02531	(10 ⁻²)			
Diferencia				1.27014	(10 ⁻²)	1		
Diferencia + Entre				4.29545	(10 ⁻²)	1	4.29545	(10 ⁻²)
							71.49	7.51

Tabla 13. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: b_{492} = b_{492_d} \quad \text{contra}$$

$$H_a: b_{492} \neq b_{492_d}$$

Y en base a lo anterior se infiere que en la técnica desarrollada existe un incremento entre el 5.74% y 13.69% en el coeficiente de extinción porcentual y de un 37.88% para la sensibilidad, encontrándose un decremento en la ordenada al origen y por lo tanto la editividad en la absorbancia debido al Reactivo Alcalino de Picrato se vea disminuida. Respecto a la diferencia observada en el coeficiente de correlación se puede indicar que la técnica desarrollada posee una mejor asociación muestral (estadísticamente no significativa) de las variables en cuestión.

Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato

Desarrollo:

-Se prepararon diluciones a partir de la Disolución Estándar "F" de Nerifolina, las cuales contengan respectivamente 10 mg% (1), 30 mg% (2), 40 mg% (3), 50 mg% (4), y 60 mg% (5).

-Se marcaron 20 tubos de ensaye (3 con A, 3 con B, 3 con C, 3 con D, 3 con E, 5 con F) y se agregó lo que indica la siguiente tabla:

Tubo	A	B	C	D	E	F	
	2 ml (1)	2 ml (2)	2 ml (3)	2 ml (4)	2 ml (5)	-	Dilución de la Disolución Estándar "F" de Nerifolina
	1 ml	1 ml	Etanol				

-Se agregó a los tubos marcados con A y a un tubo marcado con F, 5 ml de Hidróxido de Sodio al 0.8% y 2 ml de Acido 3,5 Dinitrobenzoico al 2%, se agitó mecánicamente, y se dejó reposar por 10 minutos a una temperatura de 10° C.

-Se determinó la absorbancia del contenido de los tubos A a 526 nanómetros utilizando como solución de referencia al contenido del tubo F.

-Se efectuó el mismo proceso para el contenido de los tubos B, C, D, y E.

	Valor	Grados de Libertad	F cal.	F 13, 13; 0.99
$S_{yx}^2 536$	3.501 (10^{-5})	13		
$S_{yx}^2 536_d$	3.727 (10^{-5})	13	1.064	3.91

Tabla 15. Valor calculado del Estadígrafo "F" para

$$H_0: \sigma_{yx}^2 536_d = \sigma_{yx}^2 536 \text{ contra}$$

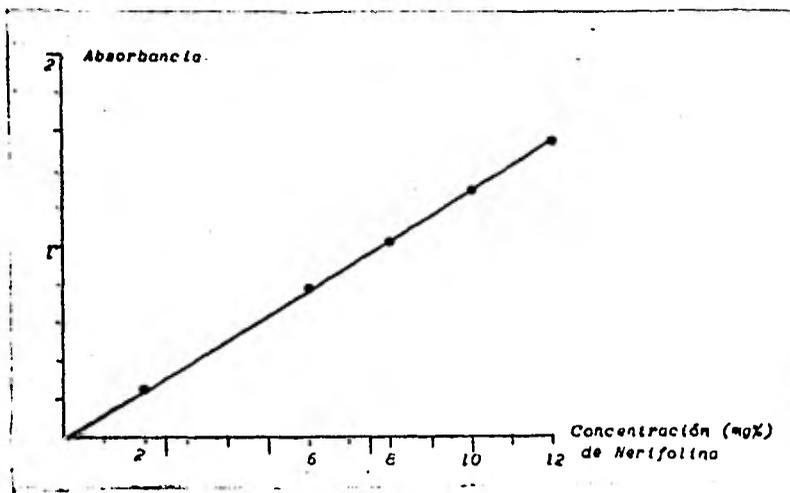
$$H_a: \sigma_{yx}^2 536_d > \sigma_{yx}^2 536$$

aunque la tabla siguiente indica un intervalo más pequeño y por lo tanto más preciso en predicción inversa (ejemplo Abs=1) para la técnica desarrollada.

Técnica	Error Típico de Estimación Relativo (%)	Estimación del Intervalo (confianza del 99%) para la predicción inversa (Abs=1) (mg%)
536	0.296	8.259 ± 0.14998
536 _d	0.305	7.821 ± 0.14831

Esto contradice la hipótesis alternativa planteada anteriormente debido a la naturaleza de la predicción inversa la que es de suma importancia en el uso de las curvas de calibración en las cuantificaciones colorimétricas.

La diferencia observada con la recta de regresión encontrada (Gráfica 14) es estadísticamente significativa (Tabla 16) lo que es debido a ambos parámetros de la ecuación de regresión (Tabla 17, Tabla 18) ($P \leq 0.01$), lo que es visualizado al calcular un intervalo de confianza (99%) para el coeficiente de extinción porcentual y la ordenada al origen para ambas técnicas, o al dar una estimación puntual para la sensibilidad.



Gráfica 14. Recta de Regresión por mínimos cuadrados, a la obediencia de la Ley de Lambert-Beer por el Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato a 536 nm en función de su Estudio Cinético.

Técnica	Intervalo de Confianza (99%) para E_1 cm, 1%	Sensibilidad	Intervalo de Confianza (99%) para la ordenada al origen (b) (Abs)
536	121.424 a 124.098	20.747	-0.020 a -0.008
536 _d	126.685 a 129.445	20.977	-0.008 a 0.005

En base a esta tabla se puede inferir que la técnica desarrollada el coeficiente de extinción se incrementa de un 2.08% a un 6.16%, así como también la sensibilidad en un 1.11%, existiendo un aumento en la ordenada al origen a un nivel sumamente aceptable (el cero de la escala de absorbancia es localizado en el intervalo calculado).

La diferencia observada en el coeficiente de correlación ocurre hasta la sexta cifra significativa lo que indica el mismo grado de asociación en las variables para ambas técnicas.

Técnica	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F_{cal}	$F_{2,26,0.99}$
536	177.6	21.8024	2.67691	$4.24807(10^{-4})$				
536 _d	177.6	22.7444	2.91322	$4.52172(10^{-4})$				
				<u>$8.76979(10^{-4})$</u>	26	$3.37300(10^{-5})$		
Dentro	355.2	44.5468	5.59014					
Entre	0.0	0.0000	0.02080					
Total	355.2	44.5468	5.61094	$2.41785(10^{-2})$	28			
Diferencia				<u>$2.33016(10^{-2})$</u>	2	$1.16508(10^{-2})$	345.41	5.53

Tabla 16. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: b_{536} + m_{536}^{(N)} = b_{536_d} + m_{536_d}^{(N)} \text{ contra}$$

$$H_a: b_{536} + m_{536}^{(N)} \neq b_{536_d} + m_{536_d}^{(N)}$$

Técnica	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F_{cal}	$F_{1,26,0.99}$
536	177.6	21.8024	2.67691	$4.24807(10^{-4})$				
536 _d	177.6	22.7444	2.91322	$4.52172(10^{-4})$				
				<u>$8.76979(10^{-4})$</u>	26	$3.37300(10^{-5})$		
Dentro	355.2	44.5468	5.59014	$3.37519(10^{-3})$	27			
Entre	0.0	0.0000	0.02080					
Total	355.2	44.5468	5.61094					
Diferencia				<u>$2.49821(10^{-3})$</u>	1	$2.49821(10^{-3})$	74.06	7.72

Tabla 17. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: m_{536} = m_{536_d} \text{ contra } H_a: m_{536} \neq m_{536_d}$$

Técnica	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F cal	F
536	177.6	21.8024	2.67691	$4.24807(10^{-4})$				1,27;0.99
536 _d	177.6	22.7444	2.91322	$4.82172(10^{-4})$				
Dentro	355.2	44.5468	5.59014	$3.37519(10^{-3})$	27	$1.25007(10^{-4})$		
Entre	0.0	0.0000	0.0208	$2.08033(10^{-2})$	0			
Total	355.2	44.5468	5.61094	$2.41785(10^{-2})$				
Diferencia				0.00000	1			
Diferencia + Entre grupos				$2.08033(10^{-2})$	1	$2.08033(10^{-2})$	166.42	7.68

Tabla 18. Análisis de Covarianza para

$$H_0: b_{536} = b_{536_d} \quad \text{contra} \quad H_a: b_{536} \neq b_{536_d}$$

Comparación de Sistemas Reaccionantes.- Al analizar los resultados de ambas técnicas desarrolladas (492_d y 536_d) por análisis de covarianza (Tabla 19) se observa que el valor obtenido del estadígrafo de contraste (F_{cal}) es demasiado elevado, lo que indica que las variables no se ajustan a una misma ecuación de regresión lineal; lo que puede ser debido a 2 causas:

-Las ecuaciones de regresión lineal no poseen igual coeficiente de regresión.

-Las ecuaciones de regresión lineal no tienen igual ordenada en el origen.

Al efectuar la prueba de hipótesis de igualdad en los coeficientes de regresión (Tabla 20) se observó que el coeficiente de regresión y directamente el coeficiente de extinción porcentual son significativamente diferentes ($P \approx 0.00$), lo que puede ser apreciado al consultar los intervalos de confianza anteriormente calculados de las técnicas desarrolladas o al convertir de unidades de extinción porcentual a unidades de extinción

Técnica	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F_{cal}
492 _d	43.2	12.0444	3.35942	1.37437(10 ⁻³)			
536 _d	177.6	22.7444	2.91322	<u>4.52172(10⁻⁴)</u> 1.82654(10 ⁻³)	26	7.02515(10 ⁻⁵)	
Dentro	220.8	34.7888	6.27264				
Entre	120.0	-1.3600	1.54183(10 ⁻²)				
Total	340.8	33.4288	6.28806	<u>3.00905</u>	28		
Diferencia				3.00723	2	1.50361	21403.31

Tabla 19. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: b_{492_d} + m_{492_d}(N) = b_{536_d} + m_{536_d}(N)$$

$$H_a: b_{492_d} + m_{492_d}(N) \neq b_{536_d} + m_{536_d}(N)$$

Técnica	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual	grados de libertad	Cuadrado Medio	F_{cal}
492 _d	43.2	12.0444	3.355942	1.37437(10 ⁻³)			
536 _d	177.6	22.7444	2.91322	<u>4.52172(10⁻⁴)</u> 1.82654(10 ⁻³)	26	7.02515(10 ⁻⁵)	
Dentro	220.8	34.7888	6.27264	7.93215(10 ⁻¹)	27		
Entre	120.0	-1.3600	1.54183(10 ⁻²)				
Total	340.8	33.4288	6.28806				
Diferencia				<u>7.91388(10⁻¹)</u>	1	7.91388(10 ⁻¹)	11265.07

Tabla 20. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: m_{492_d} = m_{536_d} \text{ contra } H_a: m_{492_d} \neq m_{536_d}$$

molar, con lo que se construye la siguiente tabla:

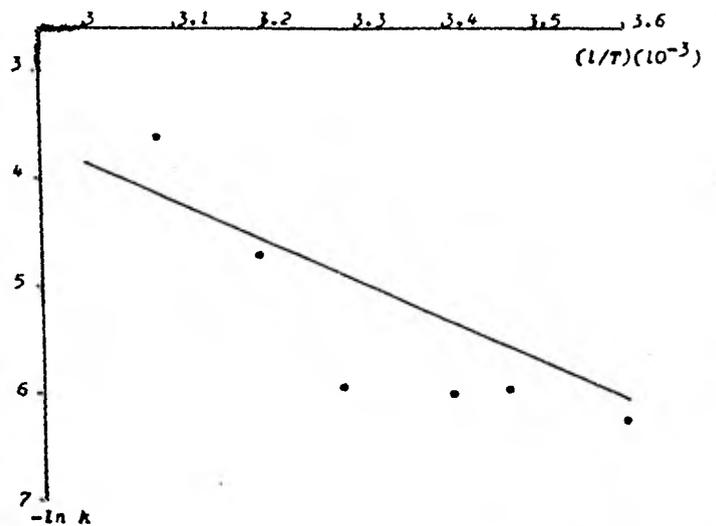
<i>Técnica</i>	<i>Estimación del Intervalo de Confianza (99%) para el Coeficiente de Extinción molar (l. / mol)</i>
492 _d	14544.978 a 15046.041
536 _d	6722.844 a 6869.310

Lo que reafirma lo anteriormente mencionado, esta diferencia estadísticamente significativa puede ser explicada en función del Análisis Cinético de los datos del Experimento V para ambos complejos (Tablas 21, 22) (Gráficas 15, 16, 17, 18).

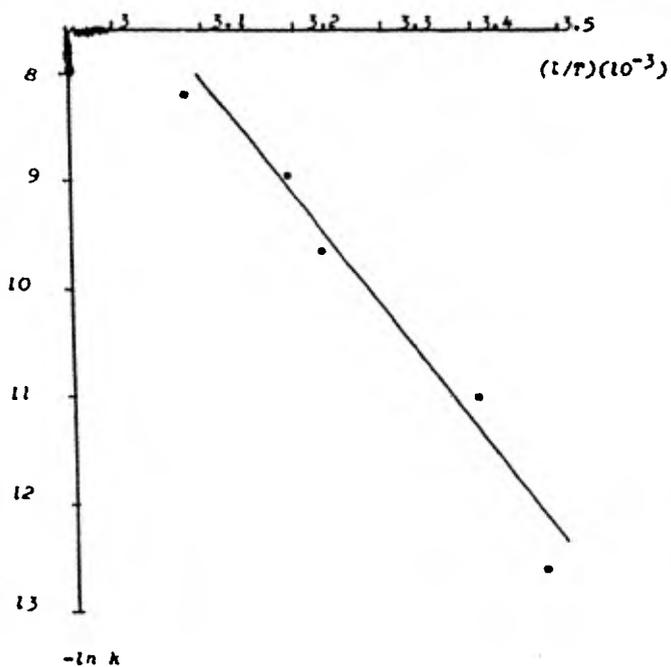
	<i>Dstrucción del Complejo Nerifalina-Picrato</i>	<i>Formación del Complejo Nerifalina-Picrato</i>
<i>Coefficiente de Regresión Lineal</i>	-9.685 (10 ³)	-4.557 (10 ³)
<i>Ordenada al Origen en la Regresión Lineal</i>	21.890	9.841
<i>Coefficiente de Correlación Lineal</i>	991.510 (10 ⁻³)	887.120 (10 ⁻³)
<i>Energía de Activación o Entalpía de la Reacción en Kcal / mol</i>	19.247	9.056

Tabla 21. Tabla de Arrhenius para la Reacción de Formación y de Dstrucción del Complejo Nerifalina-Picrato.

Gráfica 15. Gráfica de Arrhenius para la Formación del Complejo Nerifolina-Picrato.

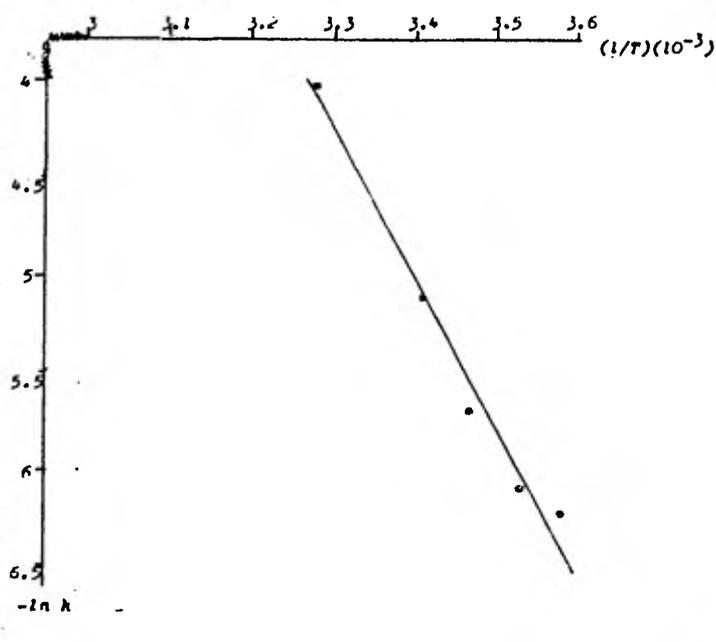


Gráfica 16. Gráfica de Arrhenius para la Destrucción del Complejo Nerifolina-Picrato.

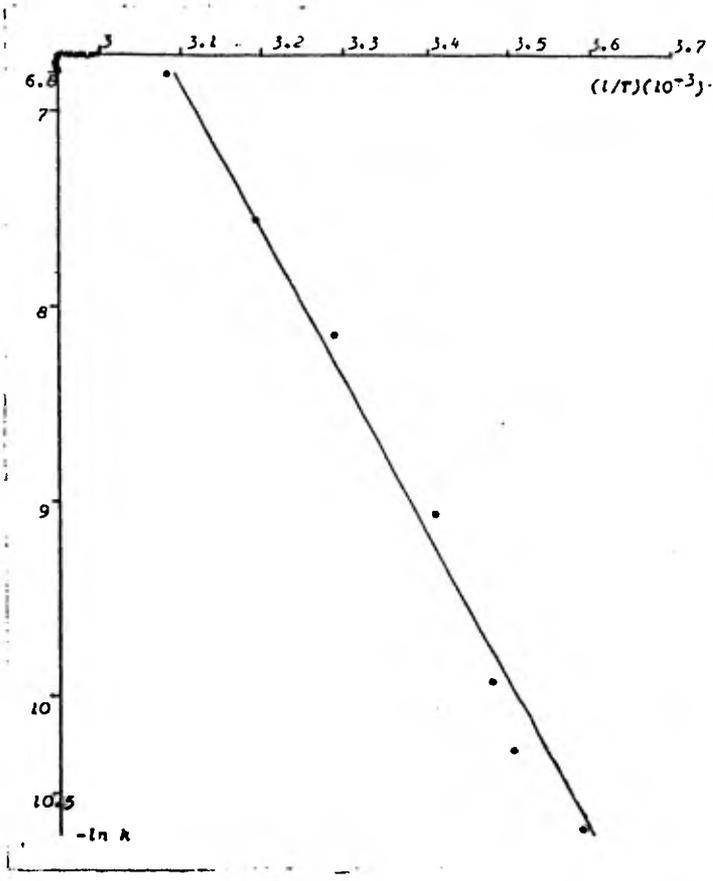


	Destrucción del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato	Formación del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato
Coefficiente de Regresión Lineal	-7.806 (10^3)	-7.715 (10^3)
Ordenada al Origen en la Regresión Lineal	17.374	21.223
Coefficiente de Correlación Lineal	996.811 (10^{-3})	986.076 (10^{-3})
Energía de Activación o Entalpía de la Reacción en Kcal / mol	15.513	15.331

Tabla 22. Tabla de Arrhenius para la Reacción de Formación y de Destrucción del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato.



Gráfica 17. Gráfica de Arrhenius para la formación del Complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato.



Gráfica 18. Gráfica de Arrhenius para la Destrucción, del Complejo Merifolina-3,5 Dinitrobenzoato.

Al construir la siguiente tabla:

Técnica	T_d (°C)	Modelo Cinético de la Absorción del Complejo (Abs)	Energía de Activación (Kcal/mol)	
			Fase de Destrucción	Fase de Formación
492 _d	10	$1.6790 - 1.2432 e^{-2.3032 (10^{-3})} \pm$	19.247	15.331
536 _d	10	$1.8291 e^{-3.8045 (10^{-5})} \pm - 1.0270 e^{-2.2576 (10^{-3})} \pm$	15.513	15.331

Se observa que a una temperatura de incubación del complejo (T_i) semejante para ambos sistemas, las ecuaciones que predicen la variable de respuesta presentan diferencias siendo la más importante la eliminación de la fase de destrucción del complejo Nerifolina-Picrato, lo que es explicado por la energía de activación; en este último complejo la energía de activación o calor de la reacción requerida para llevar el efecto de destrucción del complejo no es alcanzada por el sistema a la temperatura de incubación experimentada, lo que da lugar a una mayor respuesta de la absorbancia respecto de la variable de respuesta (absorbancia) del sistema Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato el cual sí es destruido a la temperatura mencionada ya que este presenta una fase de destrucción. Se puede observar también que la energía de activación para la formación del complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato (15.331 Kcal/mol) es inferior únicamente en 0.182 Kcal/mol de la energía de activación para la destrucción del complejo por lo que la estabilidad de este complejo respecto al complejo Nerifolina-Picrato, es inferior ya que la diferencia mencionada en este último es de 10.191 Kcal/mol. De lo antes expuesto se puede inferir que al aumentar la mencionada diferencia debe de aumentar el coeficiente de extinción, por lo que si es efectuado un estudio cinético en función de solventes y la concentración de reactivos se logrará una optimización del desarrollo de la técnica colorimétrica.

Para dar una explicación molecular del fenómeno en base al valor de los parámetros termodinámicos de la teoría de la colisión (P) y teoría de la velocidad absoluta (ΔH^* , ΔS^* , ΔG^*) (Anexo 4) para el estado de transición o complejo activado en la reacción de formación y destrucción para ambos complejos (Tablas 23, 24), se determina un intervalo de confianza (99%) para el verdadero valor del cambio de entropía (ΔS^*) y la frecuencia relativa de las colisiones con la energía suficiente (P) para dar lugar al complejo de Meisenheimer respectivo:

T °C	Formación del Complejo			Destrucción del Complejo		
	ΔS^* (cal/mol·K)	P	ΔG^* (Kcal/mol)	ΔS^* (cal/mol·K)	P	ΔG^* (Kcal/mol)
51.15	-37.960	5.058 (10^{-9})	21.336	-15.611	3.874 (10^{-4})	24.310
40.00	-39.124	2.812 (10^{-9})	21.308	-14.928	5.465 (10^{-4})	23.922
31.60	-40.637	1.315 (10^{-9})	21.440	-14.612	6.406 (10^{-4})	23.700
20.20	-39.573	2.247 (10^{-9})	20.665	-14.813	5.791 (10^{-4})	23.592
14.90	-38.818	3.284 (10^{-9})	20.238	-15.395	4.320 (10^{-4})	23.681
9.90	-38.510	3.836 (10^{-9})	19.954	-	-	-
4.85	-38.209	4.463 (10^{-9})	19.678	-	-	-

$\Delta H^* \approx 9.056$ Kcal/mol $\Delta H^* \approx 19.247$ Kcal/mol

Tabla 23. Valor del Cambio de Entropía (ΔS^*), Energía Libre (ΔF^*), Entalpía (ΔH^*) y Frecuencia Relativa (P) en el Sistema Nerifolina-Picrato.

Estimación del Intervalo (Confianza del 99%)

Sistema	Cambio de Entropía (ΔS^*) (cal / mol °K)	Frecuencia Relativa (P)
Nerifolina-Picrato	[-37.697, -40.255]	[1.477 (10^{-9}), 5.098 (10^{-9})]
Nerifolina-Dinitrobenzoato	[-15.679, -16.934]	[1.843 (10^{-4}), 3.671 (10^{-4})]

En este se observa que el cambio de entropía para la formación de estado de transición en la reacción de formación del complejo Nerifolina-Picrato es menor que el cambio entópico respectivo en la reacción de formación del complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato, lo cual puede ser atribuido a una mayor cantidad de cargas localizadas dando lugar a una solvatación más ordenada en el estado de transición de la reacción de formación del complejo Nerifolina-Picrato.

La frecuencia relativa de los choques entre las 2 moléculas (CN⁻ y AF) que poseen la energía necesaria para llevar a cabo la formación del complejo es mayor en el caso de las moléculas del Sistema Nerifolina-

T °C	Formación del Complejo			Destrucción del Complejo		
	$\Delta S^*(\text{cal/mol}\cdot\text{K})$	P	$\Delta G^*(\text{Kcal/mol})$	$\Delta S^*(\text{cal/mol}\cdot\text{K})$	P	$\Delta G^*(\text{Kcal/mol})$
50.95	-	-		-24.353	4.762 (10^{-6})	23.406
40.40	-	-		-24.175	5.207 (10^{-6})	23.093
31.20	-16.199	2.882 (10^{-4})	20.261	-23.798	6.296 (10^{-6})	22.756
20.20	-16.432	2.564 (10^{-4})	20.151	-23.620	6.887 (10^{-6})	22.442
14.20	-16.613	2.340 (10^{-4})	20.108	-24.205	5.129 (10^{-6})	22.473
10.30	-16.460	2.528 (10^{-4})	19.996	-23.932	5.886 (10^{-6})	22.296
5.90	-15.830	3.470 (10^{-4})	19.748	-24.031	5.599 (10^{-6})	22.219

$\Delta H^* \approx 15.331 \text{ Kcal/mol}$
 $\Delta H^* \approx 15.513 \text{ Kcal/mol}$

Tabla 24. Valor del Cambio de Entropía (ΔS^*), Energía Libre (ΔF^*), Entalpía (ΔH^*) y Frecuencia Relativa (P) en el Sistema Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato.

Dinitrobenzoato, debido a que el impedimento estérico y eléctrico del carbono electrófilo del 3,5 dinitrobenzoato es menor que el del picrato dado que se tiene el mismo anión furfílico.

Al observar la estructura de los complejos de Meisenheimer respectivos (Figura 2) es de esperarse que exista una deslocalización de la carga negativa más eficientemente por parte del complejo Nerifolina-Picrato, lo que da lugar a una mayor cantidad de estructuras resonantes por este complejo y por lo tanto a una estabilidad química mayor, lo que experimentalmente es demostrado al comparar los valores de cambio de entalpía (ΔH^*) (aproximadamente igual a la energía de activación) para dar lugar al estado de transición para la destrucción del complejo, la cual es mayor en el sistema Nerifolina-Picrato y por ende hay que administrar más energía para destruir al complejo Nerifolina-Picrato que para destruir el complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato.

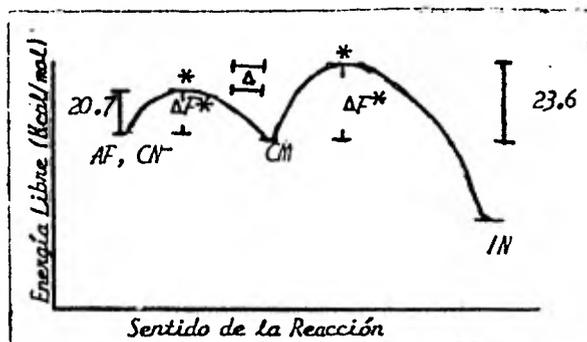
Al deslocalizar más eficientemente la carga negativa al complejo Nerifolina-Picrato, la sustitución intramolecular del compuesto nitró aromático por el oxígeno (como hidroxilo en el carbono entorce del anillo esteroidal) para dar lugar a la isonerifolina, debe de ser más probable en comparación con el complejo Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato, el cual es menos eficiente en deslocalizar la carga negativa y por lo tanto esto da lugar a que el cambio entrópico al estado de transición de este último complejo sea menor como es demostrado por la siguiente tabla:

Estimación del Intervalo (Confianza del 99%)

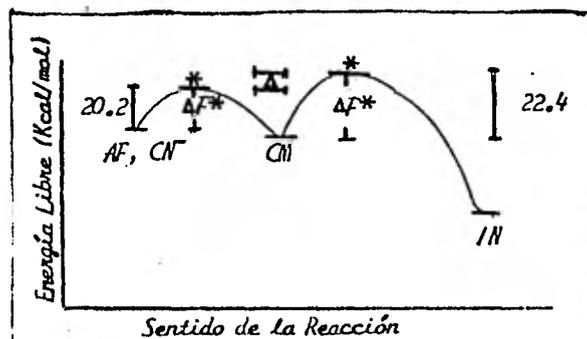
Sistema	Cambio de Entropía (ΔS^*) (cal / mol $^{\circ}R$)	Frecuencia Relativa (P)
Nerifolina-Picrato	$[-14.214, -15.930]$	$[3.011 (10^{-4}), 7.332 (10^{-4})]$
Nerifolina-Dinitrobenzoato	$[-23.661, -24.372]$	$[4.649 (10^{-6}), 6.713 (10^{-6})]$

Al efectuar una comparación en el cambio de energía libre (ΔF^*) a 20.2° C para la reacción de formación y destrucción del complejo para ambos sistemas se tienen los siguientes esquemas:

Sistema Nerifolina-Picrato



Sistema Nerifolina-Dinitrobenzoato



Donde se observa que para ambos casos:

$$\Delta F^*_{\text{destrucción}} > \Delta F^*_{\text{formación}}$$

Por lo que si se controla adecuadamente la temperatura se puede llegar únicamente a dar la energía necesaria al sistema para que de lugar al cambio de energía libre para formar el complejo, pero no para destruir lo ya que: $\Delta F^* = \Delta H^* - T \Delta S^*$.

Al efectuar la prueba de hipótesis sobre la igualdad en la ordenada al origen en las ecuaciones de regresión (Tabla 25), se observa que el valor de F_{cal} es elevado por lo que se acepta la hipótesis alternativa y esto es debido a la aditividad en la absorbancia que ejerce el Reactivo Alcalino de Picrato, lo que hace que las ecuaciones de regresión también difieran en la ordenada al origen. Por lo tanto las ecuaciones de regresión obtenidas en las técnicas desarrolladas no tienen ni una misma ordenada al origen ni un mismo coeficiente de regresión.

Técnica	Σx^2	Σxy	Σy^2	Residual	grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_{cal}
492 _d	43.2	12.0444	3.35942	$1.37437(10^{-3})$			
536 _d	177.6	27.7444	2.91322	$4.52172(10^{-4})$			
Dentro	220.8	34.7888	6.27264	$7.93215(10^{-1})$	27	$2.93783(10^{-2})$	
Entre	120.6	-1.3600	$1.54183(10^{-2})$	$4.93667(10^{-6})$	0		
Total	340.8	33.4288	6.2806	<u>3.00905</u>			
Diferencia				2.21583	1		
Diferencia * Entre grupos				2.21584	1	2.21584	75.42

Tabla 25. Análisis de Covarianza para:

$$H_0: b_{492_d} = b_{536_d} \text{ contra } H_a: b_{492_d} \neq b_{536_d}$$

Al efectuar la prueba de hipótesis para la igualdad de precisiones en ambas técnicas desarrolladas (Tabla 26), se indica la aceptación de la hipótesis nula, es decir el error típico de estimación (precisión) es el mismo para ambas técnicas.

Técnica	Valor	grados de libertad	F _{cal}	F _{13, 13; 0.99}
$S^2_{yx\ 492_d}$	1.061 (10^{-4})	13	2.847	3.910
$S^2_{yx\ 536_d}$	3.727 (10^{-5})	13	-	-

Tabla 26. Valor calculado del Estadígrafo "F" para:

$$H_0: \begin{matrix} 2 \\ yx\ 492_d \end{matrix} = \begin{matrix} 2 \\ yx\ 536_d \end{matrix} \text{ contra}$$

$$H_a: \begin{matrix} 2 \\ yx\ 492_d \end{matrix} \neq \begin{matrix} 2 \\ yx\ 536_d \end{matrix}$$

Sabiendo la importancia de la sensibilidad y la predicción inversa en la colorimetría y debido a la relación de estas con el error típico de estimación y el coeficiente de extinción se construye la siguiente tabla:

Técnica	Estimación del Intervalo (confianza del 99%) para la predicción inversa ($Abs=1$) (mg%)	Sensibilidad
492 _d	3.539 ± 0.11494	27.068
536 _d	7.821 ± 0.14998	20.977

En la que se observa que la técnica desarrollada en el Sistema Nerifolina-Picrato da intervalos de predicción inversa más precisos y es más sensible que la técnica desarrollada en el Sistema Nerifolina-Dinitro benzoato. Por lo que bajo las condiciones experimentadas, se sugiere que la técnica desarrollada en el Sistema Nerifolina-Picrato sea utilizada como técnica cuantitativa en el Estudio Comparativo del Contenido de Glucósidos Cardiotónicos en el género *Thevetia* existentes en México.

CONCLUSIONES

1) Se desarrollaron 2 técnicas colorimétricas para la cuantificación de tevetósidos cardiotónicos, en base al estudio cinético de los Complejos Nerifolina-Picrato y Nerifolina-3,5 Dinitrobenzoato en función de la temperatura.

2) El estudio cinético del complejo en función de la temperatura, permitió discernir entre 2 modelos cinéticos propuestos para la absorbancia del complejo, en función del tiempo.

3) Las diferencias observadas en las técnicas colorimétricas desarrolladas, dependen de las propiedades termodinámicas y cinéticas del sistema.

4) La optimización total del desarrollo colorimétrico, esta en función del estudio cinético del complejo.

5) Se sugiere que la técnica desarrollada del Sistema Nerifolina-Picrato, sea utilizada en la cuantificación de los tevetósidos de acción cardiotónica.

PROPOSICIONES

El estudio anterior indicó que el posible modelo cinético de la absorbancia del complejo es el número dos romano, en el cual se observa la dependencia de las propiedades cinéticas y termodinámicas de esta absorbancia con la concentración del compuesto nitroaromático y del ión etóxido, por lo que si se efectúan los siguientes estudios:

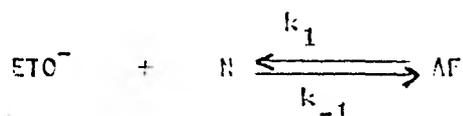
-Cinética de la Absorbancia del Complejo con la Concentración del Compuesto Nitroaromático.

-Cinética de la Absorbancia del Complejo con la Concentración del Ión Etóxido.

Se podrá llegar a:

- 1) La validez total del modelo propuesto
- 2) La optimización del desarrollo de la técnica colorimétrica.

Condicionando la reacción



Donde:

$$\frac{d(\text{N})}{dt} = k_{-1}(\text{AF}) - k_1(\text{N})(\text{ETO}^-) \quad \dots\dots(3)$$

$$\frac{d(\text{AF})}{dt} = k_1(\text{N})(\text{ETO}^-) - k_{-1}(\text{AF}) \quad \dots\dots(4)$$

A que se establezca rápidamente el equilibrio se cumple:

$$\frac{d(\text{N})}{dt} = \frac{d(\text{AF})}{dt} \quad \dots\dots(5)$$

Y al substituir (3) y (4) en (5):

$$k_{-1}(\text{AF}) - k_1(\text{N})(\text{ETO}^-) = k_1(\text{N})(\text{ETO}^-) - k_{-1}(\text{AF}) \quad \dots\dots(6)$$

Separando términos semejantes y reduciendo la ecuación:

$$2k_{-1}(\text{AF}) = 2k_1(\text{N})(\text{ETO}^-) \quad \dots\dots(7)$$

$$(\text{AF}) = (k_1/k_{-1})(\text{N})(\text{ETO}^-) \quad \dots\dots(8)$$

Al substituir (8) en (2):

$$\frac{d((k_1/k_{-1})(\text{N})(\text{ETO}^-))}{dt} = k_1(\text{N})(\text{ETO}^-) - (k_{-1} + k_2(\text{CN}^-) + k_4)((k_1/k_{-1})(\text{N})(\text{ETO}^-)) \quad \dots\dots(9)$$

Ya que la diferencial de una constante por variable, es la constante por la diferencial de la variable:

$$(k_1/k_{-1})(\text{ETC}^-) \frac{d(N)}{dt} = k_1(N)(\text{ETC}^-) - (k_{-1} + k_3(\text{CN}^-) + k_4)((k_1/k_{-1})(N)(\text{ETC}^-)) \dots (10)$$

Simplificando la ecuación anterior:

$$\frac{d(N)}{dt} = -(k_3(\text{CN}^-) + k_4)(N) \dots (11)$$

Separando variables e integrando la ecuación diferencial resultante:

$$d(N)/N = -(k_3(\text{CN}^-) + k_4) dt \dots (12)$$

$$\int d(N)/N = -(k_3(\text{CN}^-) + k_4) \int dt \dots (13)$$

$$\ln(N) = -(k_3(\text{CN}^-) + k_4)t + K \dots (14)$$

Evaluando a K en condiciones a la frontera donde a $t=0$, $(N)=(N_0)$ se tiene:

$$\ln(N_0) = -(k_3(\text{CN}^-) + k_4) \cdot 0 + K \dots (15)$$

Por lo que:

$$K = \ln(N_0) \dots (16)$$

Y al sustituir (16) en (14):

$$\ln(N) = -(k_3(\text{CN}^-) + k_4)t + \ln(N_0) \dots (17)$$

Resolviendo para (N) en (17):

$$(N) = (N_0) e^{-(k_3(\text{CN}^-) + k_4)t} \dots (18)$$

Sustituyendo a (18) y (8) en (1):

$$\frac{d(\text{CH})}{dt} = \frac{k_3 k_1}{k_{-1}} (N_0)(\text{CN}^-)(\text{ETC}^-) e^{-(k_3(\text{CN}^-) + k_4)t} - k_5(\text{CH}) \dots (19)$$

Separando las variables en (19):

$$\frac{d(\text{CM})}{dt} + k_5(\text{CM}) = \frac{k_3 k_1}{k_{-1}} (\text{CN}^-)(\text{ETC}^-)(\text{N}_o) e^{-(k_3(\text{CN}^-)+k_4)t} \dots\dots(20)$$

Multiplicando a (20) por el factor integrante $e^{k_5 t}$:

$$\frac{d(\text{CM})}{dt} e^{k_5 t} + k_5(\text{CM}) e^{k_5 t} = \frac{k_3 k_1}{k_{-1}} (\text{CN}^-)(\text{ETC}^-)(\text{N}_o) e^{(k_5 - k_3(\text{CN}^-) - k_4)t} \dots\dots(21)$$

Sabiendo que:

$$\frac{d((\text{CM}) e^{k_5 t})}{dt} = \frac{d(\text{CM})}{dt} e^{k_5 t} + k_5(\text{CM}) e^{k_5 t} \dots\dots(22)$$

Al sustituir (22) en (21)

$$\frac{d((\text{CM}) e^{k_5 t})}{dt} = \frac{k_3 k_1}{k_{-1}} (\text{CN}^-)(\text{ETC}^-)(\text{N}_o) e^{(k_5 - k_3(\text{CN}^-) - k_4)t} \dots\dots(23)$$

Al integrar la ecuación (23):

$$\int \frac{d((\text{CM}) e^{k_5 t})}{dt} = \frac{k_3 k_1}{k_{-1}} (\text{CN}^-)(\text{ETC}^-)(\text{N}_o) \int e^{(k_5 - k_3(\text{CN}^-) - k_4)t} \dots\dots(24)$$

$$(\text{CM}) e^{k_5 t} = \frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-)(\text{ETC}^-)(\text{N}_o)}{k_{-1} (k_5 - k_3(\text{CN}^-) - k_4)} e^{(k_5 - k_3(\text{CN}^-) - k_4)t} + K \dots\dots(25)$$

Resolviendo para (CM) en (25) se llega:

$$(\text{CM}) = \frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-)(\text{ETC}^-)(\text{N}_o)}{k_{-1} (k_5 - k_3(\text{CN}^-) - k_4)} e^{-(k_3(\text{CN}^-) + k_4)t} + K e^{-k_5 t} \dots\dots(26)$$

Evaluando a K en condiciones de la frontera, donde a $t=0$, $(\text{CM})=0$:

$$K = - \left(\frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-) (\text{ETO}^-) (N_0)}{k_{-1} (k_5 - k_3 (\text{CN}^-) - k_4)} \right) \dots\dots(27)$$

Y al sustituir (27) en (26) y factorizando:

$$(\text{CM}) = \frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-) (\text{ETO}^-) (N_0)}{k_{-1} (k_5 - k_3 (\text{CN}^-) - k_4)} \left(e^{-(k_3 (\text{CN}^-) + k_4)t} - e^{-k_5 t} \right) \dots\dots(28)$$

Al reordenar la ecuación:

$$(\text{CM}) = \frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-) (\text{ETO}^-) (N_0)}{k_{-1} (k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_5)} \left(e^{-k_5 t} - e^{-(k_3 (\text{CN}^-) + k_4)t} \right) \dots\dots(29)$$

La cual nos representa la cinética de la concentración del complejo de Meisenheimer según el modelo uno, pero debido a que la variable de respuesta en la experimentación es la absorbancia del complejo, de la ecuación (32) en la Fundamentación del Tema:

$$(\text{CM}) = A_{\text{CM}} / \epsilon \dots\dots(30)$$

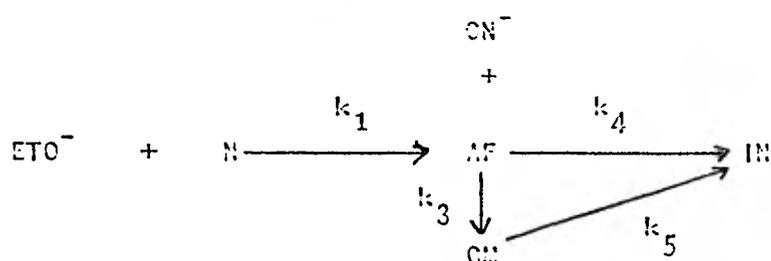
Al sustituir (30) en (29), y resolver para A_{CM} :

$$A_{\text{CM}} = \frac{k_3 k_1 (\text{CN}^-) (\text{ETO}^-) (N_0) \epsilon}{k_{-1} (k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_5)} \left(e^{-k_5 t} - e^{-(k_3 (\text{CN}^-) + k_4)t} \right) \dots\dots(31)$$

La que nos indica la cinética de la absorbancia de complejo de Meisenheimer por el Modelo 1.

Modelo II

En el modelo dos se propone el siguiente esquema reaccionante:



Donde:

- ETO^- = ión etóxido
- N = nerifolina
- AF = anión furfílico
- CN^- = anión del compuesto nitroaromático
- CM = complejo de Meisenheimer
- IN = isonerifolina
- k_i = constante de velocidad respectiva

En el cual para resolver la concentración del complejo de Meisenheimer en función del tiempo, se plantean las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$d(N)/dt = -k_1(N)(\text{ETO}^-) \quad \dots\dots(1)$$

$$d(\text{AF})/dt = k_1(N)(\text{ETO}^-) - (k_2(\text{CN}^-) + k_4)(\text{AF}) \quad \dots\dots(2)$$

$$d(\text{CM})/dt = k_3(\text{CN}^-)(\text{AF}) - k_5(\text{CM}) \quad \dots\dots(3)$$

Separando las variables de la ecuación (1):

$$d(N)/(N) = -k_1(\text{ETO}^-)dt \quad \dots\dots(4)$$

Al integrar esta ecuación:

$$\int d(N)/(N) = -k_1(\text{ETO}^-) \int dt \quad \dots\dots(5)$$

$$\ln(N) = -k_1(\text{ETO}^-)t + K \quad \dots\dots(6)$$

Determinando en (6) el valor de la constante de integración en condiciones a la frontera donde, a $t=0$, $N=N_0$:

$$K = \ln(N_0) \dots\dots(7)$$

Sustituyendo (7) en (6):

$$(N) = (N_0) e^{-k_1(ETC^-)t} \dots\dots(8)$$

Al sustituir (8) en (2):

$$\frac{d(AF)}{dt} = k_1(ETC^-)(N_0)e^{-k_1(ETC^-)t} - (k_3(CN^-)+k_4)(AF) \dots\dots(9)$$

Separando variables en (9):

$$\frac{d(AF)}{dt} + (k_3(CN^-)+k_4)(AF) = k_1(ETC^-)(N_0)e^{-k_1(ETC^-)t} \dots\dots(10)$$

Multiplicando a (10) por el factor integrante $e^{(k_3(CN^-)+k_4)t}$:

$$\frac{d(AF)}{dt} e^{(k_3(CN^-)+k_4)t} + (k_3(CN^-)+k_4) e^{(k_3(CN^-)+k_4)t} AF = k_1(ETC^-)(N_0) e^{(k_3(CN^-)+k_4-k_1(ETC^-)t)t} \dots\dots(11)$$

Integrando a (11):

$$\int \frac{d((AF) e^{(k_3(CN^-)+k_4)t})}{dt} = k_1(ETC^-)(N_0) \int e^{(k_3(CN^-)+k_4-k_1(ETC^-)t)t} \dots\dots(12)$$

$$(AF) e^{(k_3(CN^-)+k_4)t} = \frac{k_1(ETC^-)(N_0)}{k_3(CN^-)+k_4-k_1(ETC^-)} e^{(k_3(CN^-)+k_4-k_1(ETC^-)t)t} + K \dots\dots(13)$$

Y resolviendo para AF en (13):

$$(AF) = \frac{k_1(ETO^-)(N_o)}{k_3(CN^-) + k_4 - k_1(ETO^-)} e^{-k_1(ETO^-)t} + Ke^{-k_3(CN^-) + k_4)t} \dots (14)$$

Determinando a K en condiciones a la frontera ($t=0, AF=0$):

$$K = \frac{k_1(ETO^-)(N_o)}{k_3(CN^-) + k_4 - k_1(ETO^-)} \dots (15)$$

Al sustituir (15) en (14), y factorizando:

$$AF = \frac{k_1(ETO^-)(N_o)}{k_3(CN^-) + k_4 - k_1(ETO^-)} \left(e^{-k_1(ETO^-)t} - e^{-(k_3(CN^-) + k_4)t} \right) \dots (16)$$

Al sustituir (16) en (3):

$$\frac{d(CM)}{dt} = \frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3(CN^-) + k_4 - k_1(ETO^-)} \left(e^{-k_1(ETO^-)t} - e^{-(k_3(CN^-) + k_4)t} \right) - k_5(CM) \dots (17)$$

Separando variables en (17):

$$\frac{d(CM)}{dt} + k_5(CM) = \frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3(CN^-) + k_4 - k_1(ETO^-)} \left(e^{-k_1(ETO^-)t} - e^{-(k_3(CN^-) + k_4)t} \right) \dots (18)$$

Multiplicando por el factor integrante $e^{k_5 t}$:

$$\frac{d(CM)}{dt} e^{k_5 t} + k_5(CM) e^{k_5 t} = \frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3(CN^-) + k_4 - k_1(ETO^-)} \left(e^{(k_5 - k_1)(ETO^-)t} - e^{(k_5 - k_3(CN^-) + k_4)t} \right) \dots (19)$$

Y al integrar (19):

$$\int \frac{d((CM)e^{k_5 t})}{dt} = \frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_1 (ETO^-)} \left(e^{(k_5 - k_1 (ETO^-))t} - e^{(k_5 - k_3 (CN^-) - k_4)t} \right) \dots (20)$$

$$(CM)e^{k_5 t} = \frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_1 (ETO^-)} \left(\frac{e^{(k_5 - k_1 (ETO^-))t}}{k_5 - k_1 (ETO^-)} - \frac{e^{(k_5 - k_3 (CN^-) - k_4)t}}{k_5 - k_3 (CN^-) - k_4} \right) + K \dots (21)$$

Obteniendo CM de (21):

$$(CM) = \frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_1 (ETO^-)} \left(\frac{e^{-k_1 (ETO^-)t}}{k_5 - k_1 (ETO^-)} - \frac{e^{-(k_3 (CN^-) - k_4)t}}{k_5 - k_3 (CN^-) - k_4} \right) + Ke^{-k_5 t} \dots (22)$$

Evaluando a K en condiciones a la frontera, donde a t=0, CM=0:

$$K = - \left(\frac{k_3 k_1 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_1 (ETO^-)} \right) \left(\frac{1}{k_5 - k_1 (ETO^-)} - \frac{1}{k_5 - k_3 (CN^-) - k_4} \right) \dots (23)$$

Al sustituir (23) en (22) y factorizando:

$$(CM) = \frac{k_1 k_3 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_1 (ETO^-)} \left(\frac{e^{-k_1 (ETO^-)t}}{k_5 - k_1 (ETO^-)} - \frac{e^{-(k_3 (CN^-) + k_4)t}}{k_5 - k_3 (CN^-) - k_4} \right) - \left(\frac{e^{-k_5 t}}{k_5 - k_1 (ETO^-)} - \frac{e^{-k_5 t}}{k_5 - k_3 (CN^-) - k_4} \right)$$

Donde al reordenar la ecuación anterior:

$$CM = \frac{k_1 k_3 (CN^-)(ETO^-)(N_o)}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_1 (ETO^-)} \left(\frac{e^{-k_5 t} - e^{-k_1 (ETO^-)t}}{k_1 (ETO^-) - k_5} - \frac{e^{-k_5 t} - e^{-(k_3 (CN^-) + k_4)t}}{k_3 (CN^-) + k_4 - k_5} \right) \dots (24)$$

La cual nos indica la cinética de la concentración del complejo de

Meisenheimer por el Modelo II, pero ya que en la experimentación la variable de respuesta es la absorbancia del complejo, al aplicar los mismos conceptos que en el modelo uno:

$$A_{CM} = \frac{k_1 k_3 (\text{CN}^-)(\text{ETO}^-)(N_0)}{k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_1 (\text{ETO}^-)} \left(\frac{e^{-k_5 t} - e^{-k_1 (\text{ETO}^-) t}}{k_1 (\text{ETO}^-) - k_5} - \frac{e^{-k_5 t} - e^{-(k_3 (\text{CN}^-) + k_4) t}}{k_3 (\text{CN}^-) + k_4 - k_5} \right) \quad (25)$$

Esta ecuación nos representa la cinética de la absorción del complejo de Meisenheimer por el Modelo II.

Anexo II

Fórmulas de Cálculo de la Concentración del Ión Hidróxido y Etóxido en los Sistemas Reaccionantes del Trabajo Experimental.

En ambos sistemas reaccionantes se tiene el siguiente equilibrio:



El cual se establece rápidamente, por lo que la concentración de ambas especie iónicas dentro del sistema, esta únicamente en función de las constante de equilibrio de la reacción anterior.

Al tener las siguientes identidades:

$$(\text{ETC}^-) = \frac{K}{1 + K} (\text{NaOH}_0)$$

$$(\text{OH}^-) = \frac{K}{1 + K} (\text{NaOH}_0)$$

$$K = \frac{(\text{ETC}^-)}{(\text{OH}^-)} = (0.065) \left(\frac{X_{\text{ETOH}}}{X_{\text{H}_2\text{O}}} \right)$$

Y al saber que:

X = fracción molar de la molécula respectiva en el sistema reaccionante.

Es posible calcular la concentración de ión hidróxido y etóxido en el Sistema Reaccionante respectivo.

Anexo III

Análisis de Componente Único

El análisis de componente único consiste en describir (gráficamente o analíticamente) la función lineal (Ley de Lambert-Beer) existente entre una serie de soluciones de la molécula absorbente de diferente concentración, con su absorbancia respectiva bajo ciertas condiciones experimentales (λ , temperatura, disolventes, etc.).

Al efectuar una gráfica de absorbancia que es la variable dependiente, contra la concentración respectiva de la molécula o variable independiente, se obtiene una función lineal cuya ordenada al origen debe de ser cero, conociéndose a este gráfico como curva de calibración y si su coeficiente de correlación es aproximado o igual a la unidad, se indica que se cumple la Ley de Lambert-Beer en las condiciones ensayadas.

El objeto de la curva de calibración es efectuar predicciones inversas, lo que consiste en determinar dado un valor de la absorbancia su valor asociado de concentración ya sea gráficamente, por interpolación o analíticamente, mediante el coeficiente de extinción (coeficiente de regresión de la función lineal o pendiente de la recta), dentro del rango de concentraciones que obedece la Ley de Lambert-Beer.

Anexo IV

Efecto de la Temperatura en la Constante de Velocidad de una Reacción Química.

Teoría de la Colisión

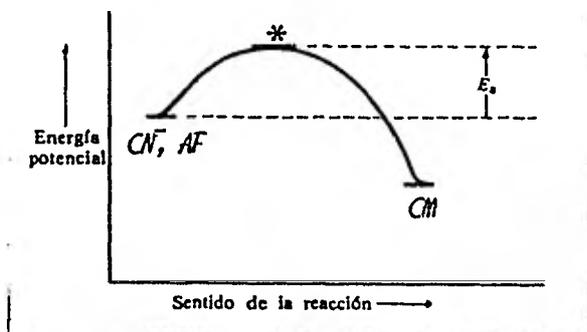
La velocidad a que tiene lugar una reacción entre 2 moléculas (por ejemplo la reacción de formación del complejo de Meisenheimer a partir del anión furílico y el anión del compuesto nitrocromático) no puede ser mayor que la frecuencia de sus colisiones en la unidad de tiempo, por lo que este concepto es de suma importancia en la velocidad de una reacción, y por ende las variables que incrementen la colisiones entre las moléculas (AF , CN^-) daran como respuesta un incremento en la velocidad de reacción.

Si se aumenta el número de moléculas en el sistema mediante el aumento en su concentración, se debe de aumentar la frecuencia de sus colisiones en la unidad de tiempo, dando lugar al efecto mencionado en la velocidad de reacción, es decir:

$$\text{velocidad} \propto \text{concentración} \quad \dots\dots(1)$$

$$\text{velocidad} = k \text{ concentración} \quad \dots\dots(2)$$

El incremento de la temperatura en el sistema también debe de aumentar la frecuencia de las colisiones en la unidad de tiempo, debido al incremento de la energía cinética de las moléculas. Sin embargo a unas condiciones de concentración y temperatura, solo una pequeña fracción de las colisiones (una de cada 10^{15}) es eficaz para producir la reacción, lo que en parte se explica por que es necesario una mínima cantidad de energía para efectuar dicha reacción, la cual se conoce como Energía de Activación; además de que la colisión necesita efectuarse con cierta orientación. El siguiente esquema nos indica un diagrama de energía para la reacción de formación del complejo de Meisenheimer (CN^-), lo que se conoce como conversión en una etapa de los reactivos al producto.



Donde (*) es llamado complejo activado, el que se localiza en un estado energético mayor por el que deben de atravesar los reactivos para llegar al producto. La diferencia entre la energía media de los reactivos y la energía del complejo activado es la Energía de Activación de la reacción hacia la derecha. Solo aquellas moléculas de los reactivos que en la colisión lleguen a tener la cantidad de energía por encima de la energía media serán capaces de reaccionar por colisión, las que nó sufrirán colisiones elásticas.

De lo anterior se puede indicar que la velocidad de una reacción química explicada por esta teoría es proporcional al número de moléculas (concentración), que en la colisión lleguen a tener valores por arriba de la energía media del complejo activado (N_i), es decir:

$$\text{velocidad} \propto N_i \quad \dots\dots(3)$$

Para eliminar el signo de proporcionalidad es necesario introducir a la frecuencia de colisiones por unidad de tiempo (Z), y la frecuencia relative de esas colisiones que posean la orientación adecuada para dar lugar a la reacción (F), por lo que (3) da:

$$\text{velocidad} = PZN_i \quad \dots\dots(4)$$

Ya que la energía cinética de (N_i) este distribuida en términos frecuencias por la Ley de Boltzman mediante la siguiente expresión:

$$r_i = \frac{N_i}{N_t} = e^{-E_a/RT} \dots\dots(5)$$

En que:

- E_a = Energía de Activación
- R = Constante Universal de los Gases
- T = Temperatura Absoluta
- N_t = Cantidad total de las moléculas de los Reactivos

Resolviendo para N_i en (5) y sustituyendo en (4):

$$\text{velocidad} = PZ e^{-E_a/RT} N_t \dots\dots(6)$$

Ya que en el trabajo experimental la cantidad se expresa como concentración, se llega a:

$$\text{velocidad} = PZ e^{-E_a/RT} \text{concentración} \dots\dots(7)$$

Al efectuar una analogía con (2) se encuentra que:

$$k = PZ e^{-E_a/RT} \dots\dots(8)$$

Pudiendose expresar como:

$$\ln k = -(E_a/R)(1/T) + \ln PZ \dots\dots(9)$$

Si se efectua el estudio cinético en función de la temperatura al tabular o al graficar:

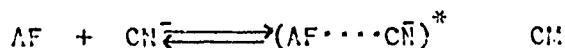
Reacción de Formación del Complejo de Meisenheimer		Reacción de Destrucción del Complejo de Meisenheimer	
T	b	T	a
1/T ₁	ln b ₁	1/T ₁	ln a ₁
1/T ₂	ln b ₂	1/T ₂	ln a ₂
1/T ₃	ln b ₃	1/T ₃	ln a ₃
⋮	⋮	⋮	⋮
1/T _n	ln b _n	1/T _n	ln a _n

Y al someter esos datos a regresión lineal se evaluará a la Energía de Activación (E_a), multiplicando al coeficiente de regresión lineal positivo (pendiente de la recta) por 1.987 (R).

Teoría de la Velocidad Absoluta

Esta teoría incorpora conceptos termodinámicos en su desarrollo, siendo parecida a la Teoría de la Colisión en el sentido en que ambas se refieren a un estado energético mayor, el cual deben de atravesar los reactivos para llegar al producto. La Teoría de la Velocidad Absoluta o del Estado de Transición en lugar de considerar colisiones y la frecuencia relativa con que la colisión es eficiente para dar lugar al producto, indica que la velocidad viene determinada por la velocidad del paso de los reactivos al estado de transición.

La teoría considera un equilibrio entre los reactivos y el producto a través del complejo activado (estado de transición); ejemplificando en nuestro caso:



Donde el asterisco es usado para denotar al estado de transición; ya que la velocidad de reacción hacia la derecha, viene dada por:

$$\text{velocidad} = v (AF \quad CN^-)^* \quad \dots (10)$$

Y que la mecánica cuántica ha demostrado que todos los estados de transición poseen una misma constante de velocidad (v), la que es:

$$v = RT/Nh$$

Donde:

- R = Constante Universal de los Gases
- T = Temperatura Absoluta
- N = Número de Avogadro
- h = Constante de Planck

Y sabiendo que:

$$K = \frac{(AF \cdots CN^-)^*}{(AF)(CN^-)} \quad \dots (11)$$

Al despejar $(AF \cdots CN^-)^*$ de (11) y sustituyendo en (10):

$$\text{velocidad} = (RT/Nh)K^*(AF)(CN^-) \quad \dots(12)$$

En la que se observa que:

$$k = (RT/Nh)K^* \quad \dots(13)$$

Considerando los siguientes conceptos termodinámicos en el equilibrio químico:

$$\Delta F^* = -RT \ln K^* \quad \dots(14)$$

$$\Delta F^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \quad \dots(15)$$

Al despejar de (14) a K^* y sustituyendo en (13):

$$k = (RT/Nh) e^{-\Delta F^*/RT} \quad \dots(16)$$

Y al sustituir (15) en (16) se llega a obtener:

$$k = (RT/Nh) e^{\Delta S^*/R} e^{-\Delta H^*/RT} \quad \dots(17)$$

En que ΔF^* , ΔS^* , y ΔH^* son las respectivas diferencias de la energía libre, entropía, entalpía estándar en el estado de transición y el estado normal de los reactivos; y esta última ecuación nos indica la dependencia de la constante de velocidad de una reacción química con la temperatura.

Efectuando una analogía de la ecuación (17) con la ecuación (9) se llega a las siguientes identidades:

$$(RT/Nh) = Z \quad \dots(18)$$

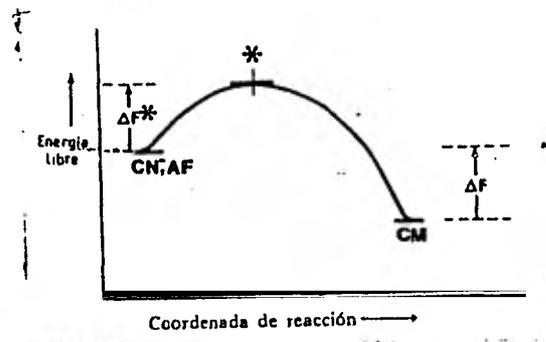
$$e^{\Delta S^*/R} = P \quad \dots(19)$$

$$\Delta H^* = E_a \quad \dots(20)$$

Concluyendo a partir de esta última identidad que el cambio de energía para llegar a estado de transición es $\Delta E^* = \Delta H^* = E_a$, ya que

el término $P(\Delta V)$ es cero, debido a que no existe cambio de volumen de una reacción química en solución.

De lo anterior se llega a plantear el siguiente esquema:



Para determinar el cambio de entropía y el factor de frecuencia relativa, se deben de emplear las ecuaciones (17) y (19) respectivamente.

B I B L I O G R A F I A

- Abrams, R., E.; Dunn, M., S.
Amer. J. Pharm.
1950, 122, 337
- Abubakirov, M., K.; Genkina, G., L.
Uzbek Khim. Zhur.
1960, (6), 63
- Akatsuka, M.
Yakugaku Zasshi
1958, 78, 62
CA 1958, 52, 6466
- Allinger, N., L.; Cava, M., P.; De Jongh, Don, C.; Jhonson, C., R.;
Lebel, N., A.; Stevens, C., L.
Quimica Orgánica
Editorial Reverté S. A.; 1973-1976
- Applications Programs, Hewlett-Packard HP-25
Hewlett-Packard Company; 1975
- Balcar, E.
Biol. Inst. Rosl. Lecznicznych
1961, 7, 167
CA 1962, 58, p3563
- Baljet, H.
Pharm. Weekbl.
1918, 55, 457
- Banes, D.
J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.
1954, 43, 355
- Banes, D.; Carol, J.
J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.
1953, 42, 674
- Bell, F., K.; Krantz, J., C., Jr.
J. Pharmacol. Exptl. Therap.
1945, 83, 213
- Bell, F., K.; Krantz, J., C., Jr.
J. Pharmacol. Exptl. Therap.
1946, 88, 14
- Bell, F., K.; Krantz, J., C., Jr.
J. Pharmacol. Exptl. Therap.
1946, 87, 198

Bell, J., K.; Krantz, J., C., Jr.
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.
1948, 37, 297

Sell, F., K.; Krantz, J., C., Jr.
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.
1949, 38, 107

Bernasconi, C., F.
J. Amer. Chem. Soc.
1970, 92(15), 4682

Bernasconi, C., F.; Bergstrom, R., G.
J. Org. Chem.
1971, 36(10), 1325

Bhatt, J., G.; Brindle, H.; Mac Donald, D., A.
J. Pharm. Pharmacol.
1961, 13, 283

Bloch, E.
Hel. Chim. Acta
1960, 453, 652

Boichinov, A.; Akhtardzhiev, Khr.; Kolev, Dim.
Farm. (Sofia)
1964, 14(5), 12
CA 1967, 66(12), 49273t

Braun, A., B.; Lusky, L., H.
J. Amer. Pharm. Ass.
1954, 43, 440

Brindle, H.; Rigby, G.
J. Pharm. Pharmacol.
1950, 2, 880

British Pharmacopoeia
1963

British Pharmacopoeia
1973

Brockelt, G.
Pharmazie
1963, 18, 673
CA 1964, 60(4), 4450h

Duffoni, F.; Giotti, A.
Boll. Soc. ital. biol. sper.
1949, 25, 108
CA 1950, 44, 10260p

Canabŕck, T.
Svensk. Farm. T.
1950, 54, 201
CA 1951, 45, 2961

Connors, K., A.
Curso de Análisis Farmacéutico
Editorial Reverté S. A.; 1980

Corona, G., Reiteri, M.
J. Chromatog.
1965, 19(2), 435

Cosgrove, F., P.; Guth, E., P.
J. Amer. Pharm. Ass.
1954, 43, 90

Demoen, P.; Janssen, P.
J. Amer. Pharm. Ass.
1953, 62(10), 635

Dequcker, R.; Leuili, J.
Planta Med.
1956, 4, 151

Dzyuba, M., P.; Vorov'ev, M., E.; Kazarinov, M., A.; Puchkova, E., I.;
Sokolova, A., I.
Postep Dziedzinnie Leku Rosl., Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp.
1970 (Pub. 1972), 53
CA 1973, 78(16), 102051v

Eastland, C., J.; Lawday, D., P.; Sellwood, E., II., D.
J. Pharm. Pharmacol.
1952, 4, 811

El-Keiy, M., A.; Ahmed, Z., F.; Abdel-Nahab, S., M.
J. Pharm. Sci. U. Arab.
Rep. 5, 155(1965) (Pub. 1965)
CA 1967, 66(6), 2254a

Ellnain-Wojtaszek, M.; Kowalewsky, Z.; Lutomsky, J.
Herba. Pol.
1975, 21(4), 377
CA 1975, 85(10), 68237a

Farmacopea Europea
1969 Vol. 1

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
1974

Farmacopea Oficial de la Rep. Italiana
1965, 7a. Edición

Fieser, L.; Fieser, M.

Steroids

Van Nostrand Reinhold Company; 1959

Frerejacque, M.

Rend. Acad. Sci.

1945, 221, 645

Frerejacque, M.; de Graeve, F.

Ann. Pharm. franc.

1963, 21(6), 509

• Fuchs, L.; Soos, E.; Kabert, I.

Sci. Pharm.

1951, 19, 73

Fuchs, L.; Wichtl, M.; Jacks, H.

Arch. Pharm. Berl.

1958, 291, 193

Fursov, A., F.

Aptech. Delo.

1961, 10, 33

CA 1962, 56, 15763

Genkina, G., L.

Khim. Prir. Soedin

1972, (3), 217

CA 1973, 78(10), 62225w

Genkina, G., L.; Abubakirov, N., K.

Med. Prom. SSSR.

1963, 17(11), 52

CA 1964, 60(6), 6703c

Genkina, G., L.; Eidler, Ya., I.

Khim. Prir. Soedin

1974, 10(1), 25

CA 1974, 81(20), 68611D

Genkina, G. L.; Eidler, Ya., I.; Shakinov, T., T.; Yamatova, R., Sh.

Khim. Prir. Soedin

1972, (6), 747

CA 1973, 79(8), 45987g

Gibaldi, M.; Perrier, D., D.

Pharmacokinetics

Leo Febiger, Philadelphia

Gold, V.; Rochester, C., H.

J. Chem. Soc.

1964, (May), 1692

- Gold, V.; Rochester, C., II.
J. Chem. Soc.
1964, (May), 1704
- Gold, V.; Rochester, C., II.
J. Chem. Soc.
1964, (May), 1710
- Gold, V.; Rochester, C., II.
J. Chem. Soc.
1964, (May), 1717
- Gold, V.; Rochester, C., II.
J. Chem. Soc.
1964, (May), 1722
- Harkis, K., J.; Rigby, G., J.
J. Pharm. Pharmacol.
1958, 10, 228
- Hassal, C.; Lippman, A., E.
Analyst
1953, 78, 126
- Hauser, M.; Kartnig, Th.; Verdino, C.
Sci. Pharm
1968, 36(2), 91
CA 1968, 69(12), 46977h
- Hauser, M.; Kartnig, Th.; Verdino, C.
Sci. Pharm.
1968, 36(4), 237
CA 1969, 70(14), 60863p
- Hui-Ying Lang; Han-Chun Sun.
Yao Hsueh Tse
1964, 11(7), 464
CA 1965, 62(19), 2465e
- Jiracek, V.; Fenert, J.
Czech (Cl, 6, 91a) Aug. 15, 1966, Appl. Sec. 31063
CA 1967, 66(25), 118900j
- Kebeya, T.; Keleni, K.; Okuna, Y.
Chem. Pharm. Bull.
1974, 22(3), 711
CA 1974, 81(3), 12643k
- Karamalukova, G.
Tr. Nauchnoissled. Khim.-Farm. Inst.
1974, 9, 252
CA 1975, 82(2), 65531g

- Karawya, M., S.; Abdel-Kader, E., M.; Khalifa, T., I.
Planta Med.
1973, 23(3), 213
- Karawya, M., S.; Abdel-Wahab, S., M.; Niazi, H., M.
Planta Med.
1974, 25(1), 7
- Karawya, M., S.; Balbaa, S., I.; Khayyal, S., E.
Planta Med.
1973, 23(1), 70
- Karawya, M., S.; El-Kiey, M., A.; El-Moghaazy, A., M.; Salem, S., A.
J. Pharm. Sci. U. A. R.
1970, 11(2), 211
CA 1972, 76(5), 23050
- Kartnig, Th.; Dauhofer-Noehammer, R.
Sci. Pharm.
1972, 40(2), 110
CA 1972, 77(26), 168683p
- Kazarinov, N., A.; Chernyshova, A., G.; Dzyuba, N., P.; Puchkova, E., I.
Farm. Zh.(Kiev)
1971, 26(2), 35
CA 1971, 75(4), 25446m
- Kazarinov, N., A.; Puchkova, E., I.; Dzyuba, N., P..
Khim.-Farm. Zh.
1969, 3(6), 42
CA 1969, 71(21), 98960G
- Kärn, M.
Dansk. Tidsskr. Farm.
1952, 20, 89
- Kedde, D., L.
Pharm. Weekbl.
1947, 82, 741
- Kennedy, E., E.
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.
1950, 39, 25
- Kimura, M., J.
J. Pharm. Soc. Jap.
1951, 71, 991
CA 1952, 46, p.6325
- Knudson, A.; Dresbach, M., J.
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.
1923, 12, 390

- Kohasi, K.; Okura, Y.; Monose, T.
Chem. Pharm. Bull.
1970, 18(11), 2151
CA 1975, 74(9), 41599y
- Kovar, K., A.
Arch. Pharm. Berl. Deut. Pharm. Ges.
1973, 305(5), 379
CA 1972, 77(9), 614166
- Kovar, K., A.
Pharm. Unserer Zeit
1972, 1(1), 17
CA 1972, 77(14), 92892h
- Kovar, K., A.
Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)
1974, 307(2), 100
CA 1974, 80(23), 132963c
- Kovar, K., A.; Francas, G.; Seidel, R.
Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)
1977, 310(1), 40
- Kurkela, A.
Pharm. Acta. Helvet.
1958, 33, 216
- Lambert, G.; Schaal, R.
J. Chim. Phys.
1962, 59, 1170
- Langejan M.
Pharm. Weekbl.
1951, 86, 593
- Langejan, M.; Pinxteren, J., A., C., van
Pharm. Weekbl.
1953, 88, 529
- Lin-Sheng Ting; Chih-Ch'en Lou
Yao Hsueh Hshch Pao
1966, 13(5), 337
CA 1967, 67(13), 61636c
- Lindig, C.; Repke, R., H.
Tetrahedron
1972, 28(6), 1847
- Lindig, C.; Repke, R., H.
Tetrahedron
1972, 28(6), 1859

Lutomsky, J.

Herba. Pol.

1965, 11(3), 112

CA 1967, 66(18), 79544z

Machova, V.; Sovova, M.

Rozvoj Farm. Ramci Ved.-Tech. Revoluce, Sb. Predriasek Sjezdu

Cesk. Farm. Spol., 7th. 1977 (Pub. 1979), 23

CA 1980, 93(12), 120461t

Makarichev, G., K.; Abubakirov, N., K.

Dokl. Akad. Nauk. SSSR.

1968, 180(5), 112

CA 1968, 69(25), 106275g

Manno, F.; Stein, M., L.; Anzelune, B.; Posocco, E.

Fitoterapia

1978, 49(2), 56

CA 1979, 90(4), 28931m

Maron, S., H.; Prutton, C., F.

Fundamentos de Fisicoquimica

Editorial Limusa Wiley, S. A.; 1971

Marthoud, R.

These Doct. (Pharmacie)

Lyon 1925

Martin, A., N.; Swabrick, J.; Cammarata, A.

Physical Pharmacy

Lee & Febiger Philadelphia; Second Edition

Mavlyanova, M., B.

Med. Zh. Uzb.

1978, (8), 42

CA 1978, 89(24), 204100e

Mesnard, P.; Lafargue, A.

Bull. Soc. Pharm. Bordeaux

1953, 92, 160

Mikhno, V., V.; Kramarenko, V., F.

Farm. Zh.

1978, (6), 52

CA 1979, 9(11), 83h

Mikhno, V., V.; Postnigan, I., G.

Farm. Zh.

1979, 137, 41

CA 1979, 91(17), 134942

Mulliken, R., S.
J. Amer. Chem. Soc.
1952, 74, 811

Newland, F.
Arch. Pharm. Berl.
1950, 283, 93

Ostle, B.
Estadística Aplicada
Editorial Limusa, S. A.; 1970

Pfordte, K.; Foerster, W.
Z. Med. Labortech
1970, 11(5), 272
CA 1971, 74(25), 136198f

Pharmacopoea Helvética
Editio Sexta, Vol. I, II; Edition Française
1971

Pharmacopoea Hungara VI
Vol. I, II
1970

Polikarpov, Yn., N.; Silkina, E., A.; Dorisov, V., G.; Zbarskii, V., L.;
Orlova, E., Yn.
Tr. Mosk. Khim.-Tekhnol. Inst.
1975, 86, 32
CA 1976, 85(25), 191776v

Popov, D., M.; Smirnov, P., N.; Semenov, V., A.
Khim.-Pharm. Zh.
1977, 11(7), 130
CA 1977, 87(20), 157233x

Paist, W., D.; Bluet, F., C.; Uhle, F., C.; Eiderfield, R., C.
J. Org. Chem.
1941, 6, 272

Prett, E., L.
Anal. Chem.
1952, 24, 1324

Rabitzsch, G.; Juengling, S.; Tambor, U.
Wiss. Beitr.; Martin-Luther-Univ. Halle-Wittenberg
1969, (6), 295
CA 1971, 74(14), 67743r

Rabitzsch, G.; Tambor, U.
Pharmazie
1967, 22(11), 668
CA 1968, 68(16), 727275v

Rengaswami, S.; Venkata, R., E.
J. Sci. Indi. Research
1958, 17D, 331

Raymond, W., D.
Analyst
1938, 62, 478

Raymond, W., D.
Analyst
1939, 64, 113

Reitnauer, R., C.
Z. Med. Laboratoriumschiangn
1980, 21(2), 106
CA 1980, 93(5), 36662b

Remingtong, R., D.; Schork, A., M.
Estadística Biométrica y Sanitaria
Editorial Prentice Hall Internacional; 1974

Rowson, J., M.
J. Pharm. Pharmacol.
1952, 4, 814

Rowson, J., M.; Dyer, F., S.
J. Pharm. Pharmacol.
1952, 4, 831

Rowson, J., M.; Simic, S.
J. Pharm. Pharmacol.
1956, 8, 1050

Selka Korbar-Smid
Farm. Vestn. (Ljublanja)
94 (1966) (Slo)
CA 1967, 66(19), 83059a

Selkopf, C.
Rev. Fac. Farm., Univ. Los Andes
1974, 15, 147

Sellés, E.; Flores, E., S.
Acta Galen. (Madrid)
1955, 8, 351
CA 1957, 51, 2234

Sivitskaya, O., K.
Aptchnoe Delo.
1961, 10(2), 50
CA 1962, 56, p.151610

- Sokal, R., R.; Rohlf, J., F.
Biometria
Diuno Ediciones; 1979
- Swoap, C., F.
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.
1948, 37, 268
- Terasova, M., G.
Tr. Leningr.-Khim-Farmatsev. Inst.
1962, (14), 65
CA 1964, 61(15), 5456c
- Tattje, D., H., E.
J. Pharm. Pharmacol.
1957, 9, 29
- Tattje, D., H., E.
J. Pharm. Pharmacol.
1958, 10, 492
- Tattje, D., H., E.; van Os, F., H., L.
Pharm. Weekbl.
1952, 88, 237
- Tsao, D., P., N.; Youngken, Jr., H., W.
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.
1952, 41, 19
- United States Pharmacopeia XIII
- United States Pharmacopeia XIV
- United States Pharmacopeia XV
- United States Pharmacopeia XVI
- United States Pharmacopeia XIX
- United States Pharmacopeia XX
- Vlasenko, L., M.
Farmatsiya (Moscow)
1969, 18(5), 52
CA 1970, 72(7), 39958r
- Vlasenko, L., M.
Farmatsiya (Moscow)
1977, 20(2), 38
CA 1977, 87(2), 63558e
- Vlasenko, L., M.
Farmatsiya (Moscow)
1980, 23(6), 35
CA 1981, 94(2), 59160

Voguel, A., I.

Química Analítica Cuantitativa, Volumen II
Editorial Kapeluz; 1969

Voigtlaender, H., W.; Salsam, C.

Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)

1969, 302, (7), 538

CA 1969, 71(11), 102183v

Zharkova, A., N.; Merchikova, N., S.; Musiichenko, A., N.; Sivitskaya, O.,
K.

Farmatsiya

1967, 16(4), 57

CA 1967, 67(24), 111482m