



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN  
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LAS  
CONSTANTES DE ACIDEZ DEL ÁCIDO  
CLONIXÍNICO EN EL CLONIXINATO DE  
LISINA EN MEDIO ACUOSO Y MEZCLAS  
ETANOL-AGUA MEDIANTE MÉTODOS  
COMPUTACIONALES.

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:  
IRMA BAUTISTA MARTÍNEZ

ASESORES:  
DRA. GUADALUPE PÉREZ CABALLERO  
M.C. PABLO HERNÁNDEZ MATAMOROS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Determinación espectrofotométrica de las constantes de acidez del ácido clonixínico en el clonixinato de lisina en medio acuoso y mezclas etanol-agua mediante métodos computacionales.

que presenta la pasante: Irma Bautista Martínez  
con número de cuenta: 09003482-8 para obtener el título de :  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Agosto de 2010.

PRESIDENTE	<u>Dra. Guadalupe Pérez Caballero</u>	
VOCAL	<u>QFB. Delia Reyes Jaramillo</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	

## AGRADECIMIENTOS

*Mamá, gracias por todas las muestras de amor, cariño y ternura que siempre tuvo conmigo, gracias por enseñarme con su ejemplo que en la vida hay que tener fuerza, carácter y disciplina para luchar por lo que uno quiere.*

*Papá Che, gracias porque no sólo fue mi papá, sino que fue un excelente padre, el mejor. Disculpe porque quizá no cubrí sus expectativas, aún así, y a pesar de nuestras diferencias, siempre sentí su respeto, apoyo, cariño y protección. Gracias por haberme guiado con la sabiduría que sólo un hombre como usted podría lograr.*

*Papá Che y Mamá Juana, gracias por haber sido mis padres, fue increíblemente fantástica la vida a su lado, soy la suma de ustedes. Disculpen la tardanza, pero valió la pena la espera.*

*Sofí, estar contigo es lo mejor que me ha pasado en la vida, gracias. Eres ese ser especial que de todo el universo cree en mí y me apoya incondicionalmente siempre. Eres el mejor regalo que me hicieron mis papás. Te quiero mucho hermanita.*

*Aly, Jaime, Yess, Samuel, Beto y Momita, su cariño, apoyo, ayuda y comprensión han sido un aliciente para poder seguir adelante. Sé que siempre puedo contar con ustedes para cualquier cosa, hasta para rescatarme de una lagartija.*

*Segis, con tu llegada a este mundo me enseñaste la lección más importante: que no hay tristeza tan grande como para no poder admirar el milagro de la vida misma. Te quiero mucho bebé.*

**El mejor equipo de mi vida es ¡MI FAMILIA!**

*Marco, no hubiera sido posible concluir esta etapa en mi vida sin tu ayuda, gracias por estar conmigo y expresarme tu amor de distintas maneras. No necesitas decirme que me quieres, si siempre me lo estás demostrando.*

*Sonia y César, queridos amigos son un enorme apoyo para mí, siempre me han mostrado su solidaridad en las buenas y en las malas, muchas gracias. Sonia eres una gran mujer y una excelente amiga.*

*A mis asesores:*

*Dra. Lupita, gracias por todo su apoyo, la paciencia y el profesionalismo que siempre me hizo sentir durante la realización de este trabajo. Es usted un gran ser humano.*

*M.C. Pablo, gracias por aceptar el compromiso y tomarme bajo su tutela profesional, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.*

*Gracias a mis sinodales:*

*Q.F.B. Guadalupe Rebollar Barrera*

*Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas*

*Dra. Raquel López Arellano y*

*Q.F.B Delia Reyes Jaramillo*

*Sus aportaciones enriquecieron enormemente éste trabajo. Les agradezco su compromiso con la educación universitaria.*

*A mis compañeros de laboratorio:*

*Mtra. Olimpia, Claudia, Daniela, Vanessa, Juan Manuel y Ely, gracias por su camaradería, ustedes fueron de enorme ayuda para poder seguir adelante en una etapa muy difícil de mi vida. Muchas gracias muchachos, fue un placer haber trabajado con ustedes.*

*Iveth, Rocío, Alfredo, Raúl, Conchita, Elena, Tere y Sandra, gracias por su amistad y el cariño que siempre me han demostrado, gracias por no dejar que me ahogara con mis propias lágrimas.*

***Gracias Universidad Nacional Autónoma de México por darme sangre azul y piel dorada.***

***¡Cómo no te voy a querer!***



## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
Índice General.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Gráficas.....	v
Índice de Gráfica de los anexos.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Tablas de los anexos.....	x
Abreviaturas.....	xi
1. Introducción.....	1
2. Objetivo General.....	4
3. Objetivos Particulares.....	5
4. Marco Teórico.....	6
4.1 Mecanismo de acción de los analgésicos antiinflamatorios no esteroides (AINEs).....	6
4.1.1 Farmacocinética y Farmacodinamia del <i>Clonixinato de lisina</i> .....	9
4.1.2 Indicaciones terapéuticas del <i>Clonixinato de             lisina</i> .....	10
4.1.3 Ventajas de <i>Clonixinato de lisina</i> .....	10
4.1.4 Desventaja del <i>Clonixinato de lisina</i> .....	11
4.1.5 Contraindicaciones del <i>Clonixinato de lisina</i> ..	11
4.2 Monografía del <i>Clonixinato de lisina</i> .....	12
4.3 Preformulación.....	13
4.4 Métodos para la determinación del pKa.....	14

4.5 Absorción de los fármacos.....	15
4.6 Espectrofotometría.....	16
4.6.1 Fallas de la Ley de Beer.....	19
4.6.2 Puntos Isosbéticos.....	20
4.6.3 Determinación de la constante de acidez empleando datos espectrofotométricos.....	21
4.6.4 Limitaciones del método espectrofotométrico.	23
4.7 Métodos computacionales.....	24
4.7.1 TRIANG.....	24
4.7.2 SQUAD.....	27
4.8 Determinación del pH.....	29
4.8.1 Determinación del pH en medio acuoso.....	30
4.8.2 Mediciones de pH en soluciones no acuosas...	32
4.9 Propiedades ácido base.....	36
4.9.1 Teoría de Brönsted y Löwry.....	36
4.9.2 Teoría de ácido y base de Lewis.....	37
4.9.3 Efecto del disolvente en las propiedades ácido-base.....	38
4.9.4 Solvatación preferencial en mezcla de disolventes.....	42
4.9.5 Parámetros empíricos de polaridad.....	43
4.9.5.1 Parámetro $E_T$ 30 o $E_T^N$ .....	45
4.10 Extrapolación de Yashuda-Shedlovisky.....	47
5. Materiales, equipo de laboratorio y preparación de soluciones.....	49

5.1 Reactivos.....	49
5.1.1 Equipo.....	50
5.2 Preparación de soluciones para la obtención de datos espectrofotométricos.....	51
6. Resultados y discusión.....	52
6.1 Espectros de absorción de la lisina en medio acuoso.....	52
6.2 Correlación de los valores de pH.....	58
6.3 Espectros de absorción del CLX-Lys en solución acuosa y mezclas etanol agua.....	59
6.4 Resultados del programa de computación TRIANG: Número de especies absorbentes.....	64
6.5 Resultados del programa de computación SQUAD	67
6.5.1 Simulación de los espectros de absorción a partir de los coeficientes de absortividad molar obtenidas por SQUAD.....	71
6.6 Predicción de las constantes de acidez .....	72
6.6.1 Regresión multiparamétrica a partir de parámetros empíricos de polaridad.....	74
6.6.2 Cálculo de ANOVA multifactorial.....	77
7. Conclusiones.....	81
8. Anexos.....	83
9. Referencias.....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Estructura molecular del <i>Clonixinato de lisina</i> (CLX-Lys).	1
2	Mecanismo de acción del CLX-Lys.	7
3	Conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos por vía de la ciclooxigenasa y a leucotrenos por la vía de la lipooxigenasa.	8
4	Familia de espectros con un punto isosbético.	20
5	Algoritmo que se usa el programa de TRIANG.	25
6	Estructura del colorante betaína fenóxido N-piridonio.	45
7	Estructura molecular del <i>ácido clonixínico</i> .	53
8	Estructura molecular del <i>aminoácido L-Lys</i> .	53

## ÍNDICE DE GÁFICAS

Gráfica No.	Título	Página
1	Espectros de absorción de la L-Lys en medio acuoso en función del pH a una $C_0 = 4.89 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	54
2	Espectros de absorción del CLX-Lys en solución acuosa en función del pH a una $C_0 = 2.45 \times 10^{-5} M$ usando blanco de lisina.	55
3	Espectros de absorción del CLX-Lys en solución acuosa en función del pH a una $C_0 = 2.45 \times 10^{-5} M$ usando blanco agua.	55
4	Espectros de absorción del CLX-Lys en medio acuoso en función del pH a una $C_0 = 2.45 \times 10^{-5} M$ usando blanco lisina al mismo pH que la muestra	56
5	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH en medio acuoso reacción ácido-base a una $C_0 = 4.90 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	60
6	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH en medio acuoso reacción base-ácido a una $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	60
7	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 10% en volumen de etanol reacción ácido-base a una $C_0 = 4.90 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	61
8	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 20% en volumen de etanol reacción ácido-base a una $C_0 = 4.90 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	61

## ÍNDICE DE GÁFICAS

Gráfica No.	Título	Página
9	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 30% en volumen de etanol reacción ácido-base a una $C_0 = 4.90 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	62
10	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 40% en volumen de etanol reacción ácido-base a una $C_0 = 4.90 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	62
11	Diagrama de distribución de especies para $H_2CLX^+/HCLX^0/CLX^-$ en medio acuoso.	65
12	Espectros de absorción simulados vs experimentales.	71
13	Método de Yashuda-Shedlovisky para el ácido clonixínico.	72
14	Método de Yashuda-Shedlovisky para el clonixinato ácido.	73
15	Medias del $psKa_1$ al 95% LSD para el porcentaje de etanol.	78
16	Medias del $psKa_1$ al 95% LSD para el método de Yashuda-Shedlovisky (YS) y los parámetros empíricos de polaridad (PP).	78
17	Medias del $psKa_2$ al 95% LSD para el porcentaje de etanol.	79
18	Medias del $psKa_1$ al 95% LSD para el método de Yashuda-Shedlovisky (YS) y los parámetros empíricos de polaridad (PP).	80

## ÍNDICE DE GÁFICAS DE LOS ANEXOS

Gráfica No.	Título	Página
A.1	Comportamiento de los valores de $\delta$ .	86
A.2	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH en medio acuoso reacción base-ácido a una $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	87
A.3	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 10% en volumen de etanol reacción base-ácido a una $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	88
A.4	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 20% en volumen de etanol reacción base-ácido a una $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	88
A.5	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 30% en volumen de etanol reacción base-ácido a una $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	89
A.6	Espectros de absorción del $H_2CLX^+$ en función del pH para un sistema al 40% en volumen de etanol reacción base-ácido a una $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$ $T = 25^\circ C$ .	89
A.7	Diagrama de distribución de especies para $H_2CLX^+/HCLX^{\neq}/CLX$ en medio acuoso.	90
A.8	Diagrama de distribución de especies para $H_2CLX^+/HCLX^{\neq}/CLX$ en un sistema al 10% en volumen de etanol.	91

**ÍNDICE DE GÁFICAS DE LOS ANEXOS**

Gráfica No.	Título	Página
A.9	Diagrama de distribución de especies para H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> /HCLX <sup>±</sup> /CLX en un sistema al 20% en volumen de etanol.	91
A.10	Diagrama de distribución de especies para H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> /HCLX <sup>±</sup> /CLX en un sistema al 30% en volumen de etanol.	92
A.11	Diagrama de distribución de especies para H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> /HCLX <sup>±</sup> /CLX en un sistema al 40% en volumen de etanol.	92
A.12	Espectros de absorción simulados vs experimentales del H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> para medio acuoso.	93
A.13	Espectros de absorción simulados vs experimentales del H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> para un sistema al 10% de etanol.	94
A.14	Espectros de absorción simulados vs experimentales del H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> para un sistema al 20% de etanol.	94
A.15	Espectros de absorción simulados vs experimentales del H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> para un sistema al 30% de etanol.	95
A.16	Espectros de absorción simulados vs experimentales del H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> para un sistema al 40% de etanol.	95

---



---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla No.	Título	Página
1	Propiedades Fisicoquímicas del <i>Clonixinato de lisina</i> .	12
2	Algunos métodos reportados para la determinación de pKa's.	14
3	Longitud máxima de absorción del CLX-Lys con diferentes pH's y blancos.	57
4	Longitudes máxima de absorción de las especies $H_2CLX^+$ / $HCLX^\pm$ / $CLX^-$ en cada sistema.	63
5	Longitudes de onda de los puntos isobésticos.	64
6	Valores de pH correspondientes al máximo de la fracción de cada especie.	65
7	Intervalos de pH's con los que se alimenta TRIANG.	66
8	Resultados de TRIANG.	67
9	Datos empleados para trabajar con SQUAD.	68
10	Resultados de SQUAD para la determinación de los valores de psKa para el ácido clonixínico/clonixinato en diversas mezclas etanol agua.	69
11	Ecuaciones obtenidas.	75
12	Valores de psKa predichos por las correlaciones multiparamétricas por Yashuda-Shedlovisky y los parámetros empíricos de polaridad.	76
13	Análisis de varianza para el psKa <sub>1</sub> .	77
14	Análisis de varianza para el psKa <sub>2</sub> .	79

## ÍNDICE DE TABLAS DE LOS ANEXOS

Tabla No.	Título	Página
A.1	Ecuaciones para el cálculo de $\delta$	84
A.2	Valores de $\delta$ en las mezclas etanol-agua.	84
A.3	Valores de $\delta$ para la parte experimental	85
A.4	Valores calculados para las constantes dieléctricas de las mezclas etanol-agua empleados en la parte experimental a $T= 25^\circ$ .	96

ABREVIATURAS

AAINES	Analgésico antiinflamatorio no esteroide.
$A$	Es la absorbancia y es adimensional.
$A$ y $B$	Constantes de la ecuación de Debye-Huckel.
$A_{\lambda}$	Absorbancia de la especie a una longitud de onda $\lambda$ .
$a_o$	Tamaño del ión.
$A^z$	Base de Brönsted y Löwry.
ANOVA	Análisis de varianza.
$b$	Longitud del trayecto óptico expresado en cm.
$c$	Concentración de la muestra.
CLX-Lys	Clonixinato de lisina.
CLX <sup>-</sup>	Clonixinato.
Co=	Concentración de la muestra las experimental expresada en M (molaridad).
COX-1	Ciclooxigenasa uno.
COX-2	Ciclooxigenasa dos.
$e$	Carga del electrón.
$E$	Potencial de la celda.
$E^{\circ}$	Potencial estándar de la celda.
$E_j$	Potencial de unión líquida.
$E_T$ 30	Parámetro empírico de polaridad, el cual mide la acidez de Lewis.
$E_T^N$	Parámetro empírico de polaridad normailizado.

## ABREVIATURAS

---

---

$\sum_S^S G_{solv}^o$	Energías específicas de solvatación de las diferentes especies.
$HA^{z+1}$	Ácido de Brønsted y Lówry.
HBA	Disolvente capaz de donar un enlace de hidrógeno.
$H_2CLX^+$	Ácido clonixínico.
HCLX $^\pm$	Íon dipolar.
$HS^+A^{z-1}$	Par iónico entre el disolvente y el ácido $HA^{z+1}$ .
$kT$	Energía de agitación térmica.
LEM	Laboratorio de especialidades multidisciplinarias.
$M^{z-}$	Ión metálico M con carga $z+$
$m_H$	Molalidad del ion hidronio.
$p_{aH}$	Logaritmo negativo de la actividad del ión hidronio.
$pH^*$	Logaritmo negativo de la concentración del ión hidronio en el sistema semiacuoso.
$pH_d, pH_e$	Logaritmo negativo de la concentración de los iones hidronio en una disolución d y una disolución e respectivamente.
PEG	Prostaglandina.
PEGII	Prostaglandina dos.
PEGFII	Prostaglandina F dos.
$P$	Luz emergente de la disolución.
$P_o$	Luz incidente sobre la disolución.
${}^S_s pK_a$	$pK_a$ del ácido HA en el disolvente S tomando como uno al coeficiente de actividad en el disolvente S a dilución infinita.

## ABREVIATURAS

---

---

${}^{vac} pK_{HA}^o$	Constantes intrínsecas de la disociación de una sustancia, del disolvente protonado en el vacío y del protón solvatado, determinadas en el vacío.
${}^{vac} pK_{HS^+}^o$	
${}^{vac} pK_{H_3O^+}^o$	
psKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez de un ácido, en una disolución no acuosa.
r	Radio de los iones solvatados $HA^{z+1}$ , $A^{z-1}$ y $HS^+$
S	Disolvente capaz de aceptar iones hidronio.
T	Transmitancia.
T=	Temperatura.
U	Cuadrado de las diferencias de absorbancia entre la experimental y la propuesta por SQUAD.
UV-Vis	Ultravioleta visible
$X_i$	Fracción molar del componente "i".
$z$	Carga de la especie ácida $HA^z$ .
$\delta$	Valor de correlación entre pH en medio semiacuoso y pH en medio acuoso.
$\Delta E_j$	Potencial residual de unión líquida.
$\Delta G_T^o$	Energía libre de Gibbs de transferencia entre el disolvente y el vacío de las especies $HA^{z+1}$ y $A^{z-1}$
$\Delta T$	Error en las lecturas de transmitancia.
$\varepsilon_\lambda$	Coefficiente de absortividad de la especie a una longitud de onda $\lambda$
$\frac{\varepsilon_M - 1}{2\varepsilon_M + 1}$	Término que toma en cuenta las interacciones electrostáticas entre el soluto y el disolvente.
$s_\varepsilon, w_\varepsilon$	Constante dieléctrica del disolvente S y del agua respectivamente.
$\gamma_H$	Coefficiente molal de actividad del ión hidronio.

# 1. INTRODUCCIÓN

El *clonixinato de lisina* (CLX-Lys) es un principio activo que funciona como analgésico antiinflamatorio del tipo no esteroide (AAINES); su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la ciclooxigenasa-1, (COX-1) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), que son las enzimas responsables de la síntesis de las prostaglandinas y tromboxanos, las cuales participan en los procesos de inflamación, dolor y fiebre.

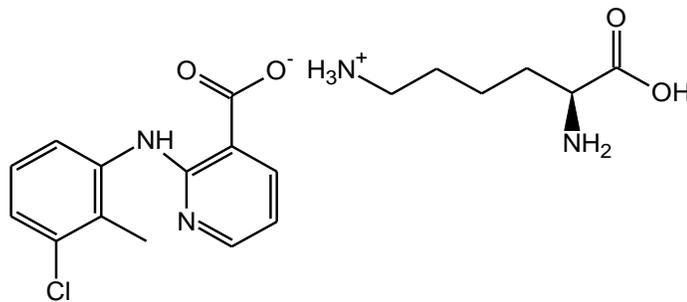


FIGURA No. 1 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL  
*CLONIXINATO DE LISINA* (CLX-Lys)

En humanos el CLX-Lys se utiliza principalmente contra enfermedades reumáticas, dolor postquirúrgico, dolores de cabeza, migraña, dolores dentales, etc. No produce problemas respiratorios, ni dependencia psíquica ni física y no causan tolerancia (1).

El conocimiento de las constantes de acidez, pKa's, permite inferir sobre las propiedades de solubilidad, estabilidad, absorción, actividad y dosificación del *clonixinato de lisina* en el organismo. Esta información es esencial en la propuesta de formulación de nuevos medicamentos. Hasta ahora, para el *clonixinato de lisina* existe reportado un sólo valor de pKa (2). El LEM-Farmacia y la Sección de Química Analítica de la FES Cuautitlán, han desarrollado estudios para la caracterización fisicoquímica del *clonixinato de lisina* en agua y mezclas etanol-agua. La importancia de estos estudios radica en que este tipo de mezclas son empleadas como excipientes en algunas formas farmacéuticas. Las mezclas etanol agua son empleadas, en la elaboración de soluciones inyectables. En este tipo de forma farmacéutica el límite de concentración de etanol debe estar dentro del intervalo de 5-10% v/v, ya que por arriba de 10% causaría dolor al ser aplicado (3) y por abajo del 5% tal vez perdería su función como disolvente al emplear mezclas etanol-agua el valor de pKa, varía razón por la cual es importante realizar estudios en este tipo de mezclas. En el presente trabajo fue posible obtener los valores psKa\* para ambos porcentajes. Adicionalmente, las mezclas etanol-agua generan un medio lipófilico, que permiten comprender el comportamiento de esta molécula en un sistema, biológico ya que las interacciones tienden a ser más lipofílicas que hidrofílicas en dichos medios.

---

\*la letra "s" es sólo para diferenciar que se trata de un pKa calculado en un solvente diferente al agua

En el presente trabajo fue posible la determinación de dos constantes de acidez en agua y en mezclas etanol agua a partir de medidas espectrofotométricas; además, se constató que, bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, la absorbancia medida en el intervalo de  $\lambda = 220-400$  nm, corresponde al *ácido clonixínico* ( $H_2CLX$ ). Además, la presencia de puntos isosbéticos puso de manifiesto la existencia de los equilibrios ácido-base. Por lo que los datos espectrofotométricos se alimentaron en los programas computacionales TRIANG y SQUAD (4,5,6) para determinar el número de especies absorbentes y los valores de pKa's respectivamente.

Por otra parte, se realizaron dos correlaciones multiparamétricas, con el fin de predecir las constantes de acidez para otras mezclas de composición intermedia, no determinadas experimentalmente en este estudio.

- 1) La función Yasuda-Shedlovisky (7,8), es útil para la obtención, mediante extrapolación, del valor de un pKa en medio acuoso a partir de los valores de psKa en medios semi-acuosos, cuando un compuesto es poco soluble en agua. Asimismo permite predecir por interpolación, valores de psKa's (como es nuestro caso) para mezclas de diferente composición.
- 2) Una regresión multiparamétrica involucrando el término de Kirwood, que mide las interacciones no específicas del disolvente y el parámetro empírico de polaridad normalizado  $E_T^N$ , relacionado con la acidez de Lewis, propuesto por Reichardt.

Los resultados por ambos métodos fueron comparados estadísticamente mediante la prueba de ANOVA multifactorial.

# 1. OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL:

Determinar espectrofotométricamente las constantes de acidez del *ácido clonixínico* presente en el *clonixinato de lisina*, a través de los programas computacionales SQUAD y TRIANG, en agua y en mezclas etanol agua (10,20, 30 y 40% V/V) para contribuir a su caracterización fisicoquímica.

## 2. OBJETIVOS PARTICULARES

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✓ Establecer las condiciones experimentales óptimas para la obtención de los espectros de absorción en función del pH para el *clonixinato de lisina*.
- ✓ Determinar el número de especies absorbentes y el valor de las constantes de acidez mediante los programas computacionales TRIANG y SQUAD respectivamente, a partir de los datos espectrofotométricos en cada medio.
- ✓ Analizar los valores de las constantes de acidez obtenidas en función de las propiedades de los medios para analizar las interacciones de las moléculas con el disolvente.
- ✓ Proponer los equilibrios de acidez y asociar a cada equilibrio la constante correspondiente.
- ✓ Predecir las constantes de acidez por el método de Yasuda-Shedlovisky y los parámetros empíricos de polaridad en mezclas etanol agua.

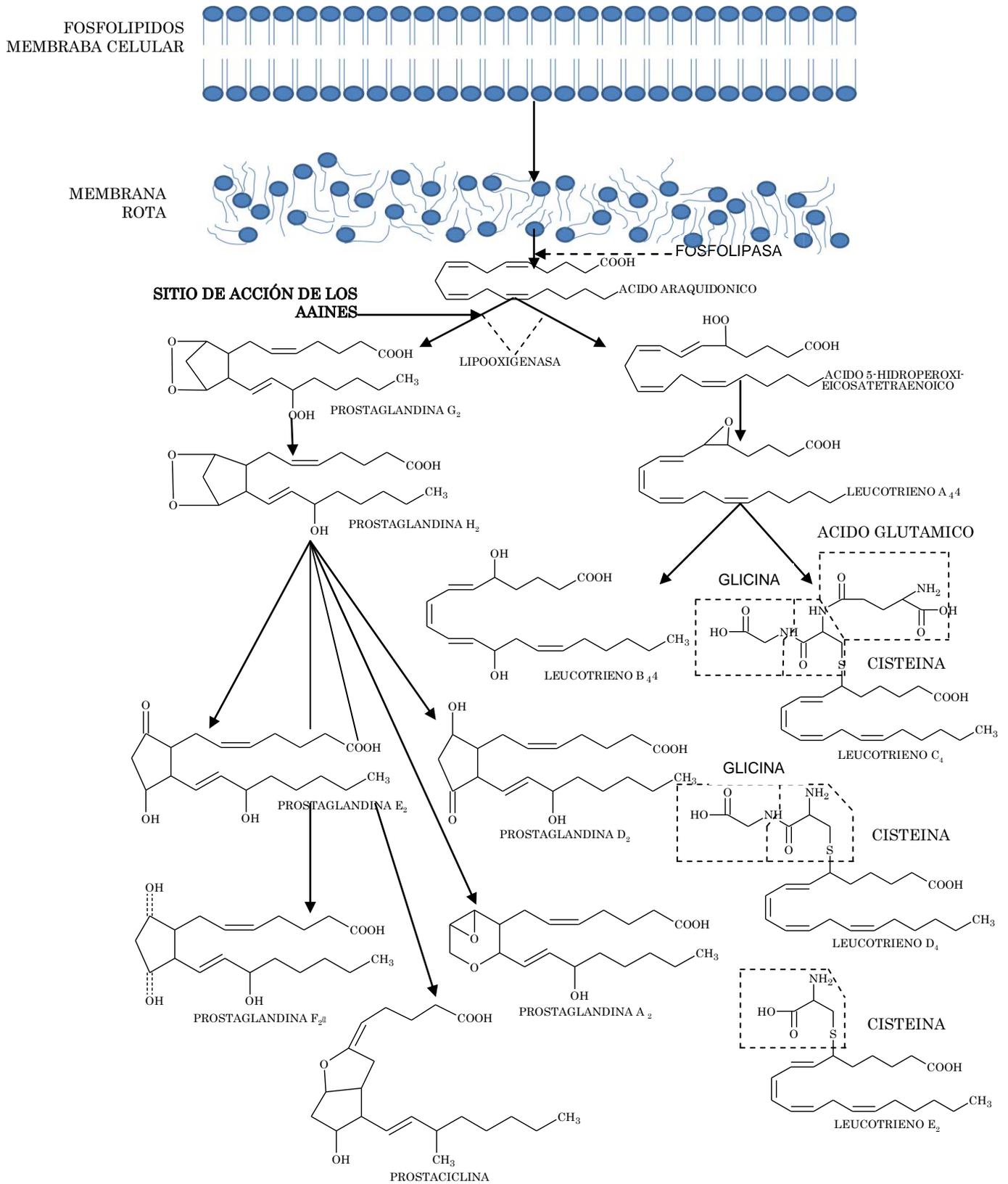
## 3. MARCO TÉORICO

### 4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES (AINES)

El mecanismo de acción del *clonixinato de lisina* (CLX-Lys), de acuerdo a Pineros (9), aún no ha sido elucidado. Sin embargo, se presupone que actúa de manera semejante a los analgésicos antiinflamatorios del tipo no esteroides, abreviados AAINES.

De manera general, estos analgésicos reducen los síntomas de dolor inflamación y fiebre. La acción principal de todos los AAIES es la inhibición de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) y de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzimas que convierten el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, los cuales se transforman en prostaglandinas y en tromboxanos mediadores de la inflamación ver figura No.2 (1).

# MARCO TEÓRICO



**FIGURA No 2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL CLX-Lys**

Al inhibir a las ciclooxigenasas y la subsecuente síntesis de prostaglandinas, se reduce la liberación de sustancias y mediadores inflamatorios, previniendo de esta forma la activación de los nociceptores terminales; de modo que los AAINES alivian el dolor asociado con la inflamación. El hecho de que los AAINES no produzcan sueño, ni alteración en el humor, ni provoquen alteraciones en la conciencia, hace postular que su sitio de acción sea el hipotálamo.

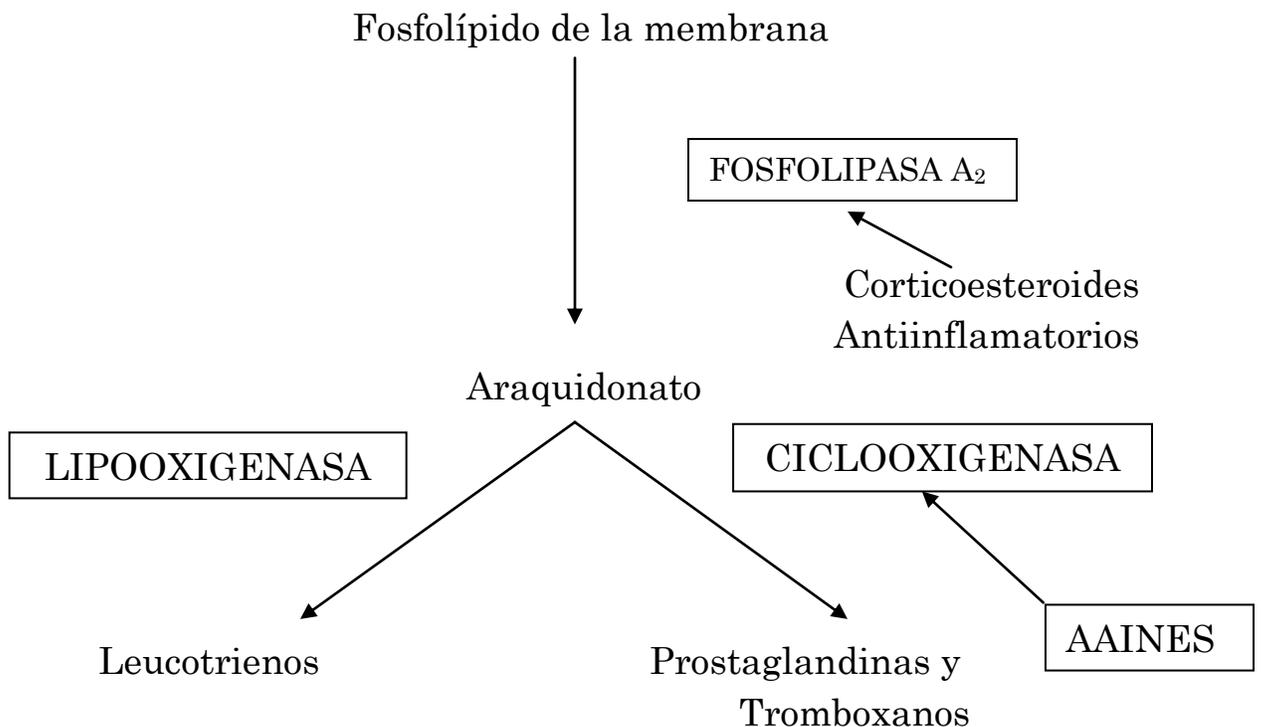


FIGURA No. 3 CONVERSIÓN DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO A PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS POR VÍA DE LA CICLOOXIGENASA Y A LEUCOTRENIOS POR LA VÍA DE LA LIPOOXIGENASA.

La figura No. 3 indica por qué los AAINES sólo inhiben la síntesis de la ciclooxigenasa con lo cual reduce los efectos secundarios que se les atribuye a los antiinflamatorios corticoides (10).

#### 4.1.1 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL CLONIXINATO DE LISINA

El *clonixinato de lisina* es un derivado del ácido antranílico que inhibe la enzima prostaglandina sintetiza a nivel cromosomal, responsables de la síntesis de prostaglandinas; al inhibir esta enzima no se sintetiza la PEG y la PGE II ni la PEGF II y esto conlleva a la disminución de la bradicardia. De esta manera, de forma indirecta, se impide la sensibilización de los receptores dolorosos periféricos y se consigue la eliminación del dolor.

Las concentraciones séricas por vía oral o intravenosa, son similares a partir de los 75 minutos; a los 240 minutos disminuyen hasta desaparecer a los 360 minutos, lo que muestra el bajo poder acumulativo de este fármaco a nivel sérico. Se deposita ampliamente en todos los tejidos. (11) Se biotransforman vía hepática por la familia enzimática del citocromo, en su mayoría cuentan con buena biodisponibilidad; su excreción es fundamentalmente renal y, en su mayoría, en forma de productos de biotransformación. La velocidad de absorción puede ser menor si se combina con alimentos, aunque se sugiere su administración acompañada de alimentos o antiácidos para disminuir el efecto negativo sobre la mucosa gástrica, sobre todo cuando es administrado por un largo período de tiempo (1).

#### 4.1.2 INDICACIONES TERAPEÚTICAS DEL *CLONIXINATO DE LISINA*

El CLX-Lys está indicado como analgésico en padecimientos que causan dolor agudo o crónico en las diversas especialidades médicas

I.- Cirugía: dolor post-quirúrgico e intervenciones ginecológicas, ortopédicas, urológicas y de cirugía en general.

II.- Traumatología y ortopedia: dolor por traumatismo en general, fracturas, mialgias, lumbalgias, esguinces, etc.

III.- Ginecología y urología: dismenorrea, dolor post-parto, cistitis, prostatitis, etc.

IV.- Odontología y proctología: odontalgias, dolor por hemorroides y cirugía proctológica.

V.- Medicina general: dolor reumático, gota, cefaleas, sinusitis, neuralgias.

VI.- Oncología: cuadros dolorosos en pacientes con cáncer.

#### 4.1.3 VENTAJAS DEL *CLONIXINATO DE LISINA*

- ✓ No producen depresión respiratoria
- ✓ No producen dependencia psíquica ni física
- ✓ No desarrollan tolerancia

#### 4.1.4 DESVENTAJAS DEL *CLONIXINATO DE LISINA*.

El *clonixinato de lisina* puede causar:

- Esofagitis (siendo sus complicaciones más frecuentes hemorragia y perforación)
- Gastroduodenitis
- Lesiones tóxicas
- Indigestión y diarrea

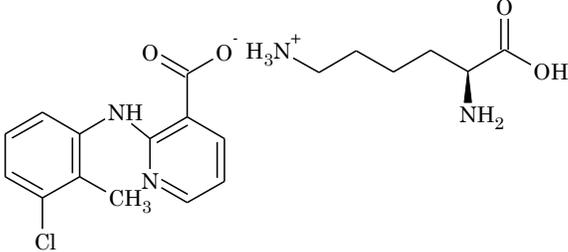
#### 4.1.5 CONTRAINDICACIONES DEL *CLONIXINATO DE LISINA*

No se debe administrar el *clonixinato de lisina* a persona:

- A menores de 10 años
- A personas de la tercera edad
- A personas sensibles al fármaco
- No se recomienda su uso en mujeres embarazadas o que se encuentren lactando.
- Personas que presenten defectos en la coagulación
- Personas que presenten alteraciones en la función renal
- Personas que presenten alteraciones en la función cardíaca
- Personas que presenten alteraciones de la función hepática
- Personas que presenten con antecedentes de patologías gástricas

4.2 MONOGRAFÍA DEL *CLONIXINATO DE LISINA*

**TABLA No. 1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL *CLONIXINATO DE LISINA***

Nombre químico	Sal de L-lisina 2-(3-cloro-2-metilfenil)amino)-3-piridina ácido carboxílico(12) Lisina 2-(2-metil-3-cloro-anilina)-3 nicotinato(12)
Propiedades físicas	Polvo fino amorfo, de color amarillo claro, de olor característico muy irritante y picante de sabor amargo. (13,14)
Número de registro CAS	CAS 55837-30-4(15)
Fórmula empírica	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> (15)
Peso molecular	408.88 g/mol(15)
Fórmula estructural	 <p style="text-align: right;">(9)</p>
Punto de fusión	205°-210°C (con descomposición) (12)
Solubilidad	Soluble en agua y soluciones alcalinas diluidas Ligeramente soluble en metanol y etanol Prácticamente insoluble en acetona, tolueno y cloroformo.(12)
Conservación	En recipientes cerrados. Almacenar a temperaturas que no excedan los 15°C (El refrigerador puede ser utilizado).(12)

### 4.3 PREFORMULACIÓN

Cualquier principio activo que se pretenda comercializar para su empleo con un fin terapéutico, debe pasar por una serie de etapas encaminadas a la obtención de un medicamento seguro y eficaz, para lograrlo es necesario un trabajo multidisciplinario hasta que se obtiene la forma farmacéutica más adecuada para ese principio activo. A este trabajo se le conoce como preformulación y abarca el conocimiento de las características biofarmacéuticas, fisicoquímicas, farmacotécnicas y el desarrollo de la forma farmacéutica final.

Las características fisicoquímicas y farmacotécnicas que deben ser consideradas son: (16)

- Cristalinidad y polimorfismo
- Punto de fusión
- Solubilidad, en la cual se ven involucrados:
  - El valor del pKa
  - Influencia de la temperatura
  - Perfil de solubilidad en función del pH
  - Coeficiente de reparto
  - Mecanismo de solubilización
  - Velocidad de disolución
- Fluidez
- Estabilidad
- Compatibilidad

#### 4.4 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL pKa.

Existen diferentes métodos por los cuales se puede determinar experimentalmente las constantes de equilibrio, algunos de estos métodos se muestran en la tabla No.2 (17)

**TABLA No. 2 ALGUNOS MÉTODOS REPORTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE pKa's**

MÉTODO	REFERENCIA
Titulación potenciométrica	Rosenberg y Wagenknecht (1986)
Espectrofotometría UV-Vis	Asuero et al. (1986)
Medición de la solubilidad	Zimmerman (1986a, 1986b)
Técnicas de HPLC	Gustavo González (1993)
Electroforesis capilar	Chauret et al. (1995)
Formación de espuma	Alvarez Nuñez y Yalkowsky (1997)

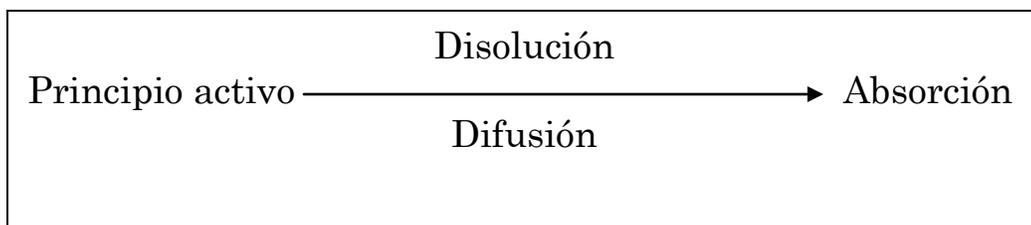
Dentro de estos métodos, uno de los más empleados es la espectrofotometría UV-Vis. Para poder procesar los datos espectrofotométricos se tiene que considerar la complejidad del sistema. Es recomendable plantear un modelo químico que sea representativo del sistema, acorde con el número y la naturaleza de las especies en solución. En sistemas sencillos el tratamiento de los datos experimentales puede simplificarse aplicando métodos gráficos tradicionales pero, para casos de sistemas más complejos se requiere de la aplicación de métodos gráficos más sofisticados o bien de métodos computacionales.

#### 4.5 ABSORCIÓN DE LOS FÁRMACOS

La absorción de un principio activo consiste en el paso de sus moléculas desde el lugar de su administración hasta la circulación sanguínea, a través de una barrera biológica. Esta absorción no puede realizarse si no es a partir de una dispersión molecular del fármaco en el medio biológico del lugar de administración, es decir, a partir de una solución acuosa.

La absorción de un principio activo depende de numerosos parámetros entre los que destacan principalmente las propiedades fisicoquímicas de la molécula del fármaco. Este fenómeno depende también de las etapas que le han precedido en la fase biofarmacéutica, puesto que no puede absorberse más principio activo que el que se ha liberado previamente de la forma farmacéutica, y disuelto en el medio biológico del sitio de administración. Las etapas de liberación y disolución pueden ser factores limitantes de la absorción propiamente dicha, tanto en la magnitud como en la velocidad.

Para ser absorbido, todo principio activo debe disolverse previamente, excepto en algunos casos, debido a su velocidad de absorción está en función de su velocidad de disolución en los líquidos del organismo (por ejemplo, conducto gastrointestinal) y de la velocidad de difusión de sus moléculas disueltas en estos medios líquidos, hacia las paredes celulares, como se muestra en la siguiente figura



Esto corresponde al principio anunciado por Benet: “antes de cruzar una membrana biológica, el principio activo debe ser solubilizado en los líquidos que bañan la membrana”

La absorción de un principio activo depende de:

- Su velocidad de disolución en el medio biológico que baña las membranas.
- Sus características fisicoquímicas propias, capaces de influir en los modos de absorción (pKa, coeficiente de reparto, estabilidad, etc). Esta aptitud del fármaco a ser más o menos fácilmente absorbido es lo que llamamos “absorbilidad” propiamente dicha y no depende más que de sus propios caracteres fisicoquímicos. (18).

### 4.6 ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría es una técnica de análisis químico en donde el uso de la radiación electromagnética se aplica en la determinación de la concentración de sustancias químicas. Su fundamento se basa en que algunas moléculas tienen la capacidad de absorber un fotón, provocando que la energía de la molécula se incremente o, si pierde dicho fotón, su energía se verá disminuida. Estos cambios pueden observarse a través del espectrofotómetro.

Cuando una muestra absorbe luz, la potencia radiante del haz de luz disminuye. La potencia radiante,  $P$ , se evalúa como energía por segundo por unidad de área de luz. La luz se hace pasar por un monocromador (un prisma, una rejilla de difracción o un filtro) para aislar, una sola longitud de onda. Esta última, de potencial radiante  $P_0$ , incide sobre una muestra de espesor  $b$ . La potencia radiante del haz emergente es  $P$ , la muestra puede absorber una fracción de la luz, de manera que  $P \leq P_0$ .

La transmitancia,  $T$ , se puede definir como la fracción de la luz incidente que sale de la muestra.

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (4.1)$$

Por lo tanto,  $0 < T < 1$ . La *transmitancia porcentual* es simplemente  $100T$  y  $0\% < \%T < 100\%$

Una magnitud física más útil es la absorbancia, que se define como

$$A = \log_{10} \left( \frac{P_0}{P} \right) = -\log T \dots\dots\dots (4.2).$$

Cuando no se absorbe la luz,  $P=P_0$  y entonces  $A = 0$ . Cuando se absorbe 90% de la luz, 10% de ella se transmite y  $P=P_0/10$ . Con esto se tiene  $A = 1$ . Cuando sólo se transmite el 1% de la luz,  $A = 2$ . La absorbancia también se llama a veces *densidad óptica*, que se abrevia DO y en ocasiones se representa con  $E$ .

La importancia de la absorbancia estriba en que es directamente proporcional a la concentración de especie absorbente en la muestra:

$$A = \epsilon bc \quad (4.3)$$

La ecuación 4.3 es fundamental para aplicar la espectrofotometría en química analítica, se denomina ley de Beer - Lamber, o simplemente ley de Beer. La absorbancia  $A$ , es adimensional. La concentración de la muestra,  $c$ , suele expresarse en moles por litro (M). La longitud del trayecto óptico,  $b$ , se expresa comúnmente en centímetros. La letra  $\epsilon$  se llama coeficiente de absortividad molar y sus unidades son  $M^{-1}cm^{-1}$  puesto que el producto  $\epsilon bc$  debe ser adimensional. La absortividad molar es la propiedad característica de las sustancias que indica cuánta luz se absorbe a una longitud de onda dada.

La ecuación (4.3) se puede escribir:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} bc$$

(4.4)

debido a que los valores de  $A$  y  $\epsilon$  dependen de la longitud de onda de la luz. La cantidad  $\epsilon$  es simplemente un coeficiente de proporcionalidad entre la absorbancia y el producto  $bc$ . A mayor  $\epsilon$ , mayor es  $A$ . Un espectro de absorción es una gráfica que indica en qué forma  $A$  (o  $\epsilon$ ) depende de la longitud de onda.

#### 4.6.1 FALLAS DE LA LEY DE BEER

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración de las especies absorbentes. Esto se verifica muy bien en el caso de soluciones diluidas ( $\leq 0.001$  M) de la mayoría de las sustancias. Las fallas aparentes de la ley de Beer en soluciones con concentraciones más altas pueden atribuirse a cambios en las especies absorbentes o en las propiedades de la solución.

Conforme una solución se vuelve más concentrada, las moléculas de soluto interactúan entre sí debido a su proximidad. Cuando una molécula interactúa con otra, es probable que cambie las propiedades eléctricas de ambas (incluyendo la absorción de la luz). Como resultado se tiene que la gráfica de absorbancia en función de la concentración deja de ser una línea recta. En caso excepcional de una solución muy concentrada, el soluto se *convierte* en el solvente. Es claro que no puede esperarse que las propiedades eléctricas de una molécula sean las mismas en diferentes solventes<sup>1</sup>. En algunos casos, solutos que no absorben pueden interactuar con las especies absorbentes y modificar la absorptividad aparente.

La interacción física de dos solutos es sólo un caso de equilibrio químico (la asociación de dos solutos) que afecta la absorbancia observada. Otro caso aún más simple es el de un electrólito débil. En solución concentrada predomina la forma no disociada, HA, del ácido. Conforme se diluye la solución, la

---

<sup>1</sup> La absorbancia aparente también depende del índice de refracción,  $n$ , de la solución. Para concentraciones de soluto suficientemente altas, el índice de refracción cambia y la variación de la absorbancia parece no obedecer la ley de Beer. La dependencia de la absorbancia respecto al índice de refracción ésta por  $A = \epsilon bcn / (n^2 + 2)^2$ .

disociación se incrementa. Si la absorptividad de  $A^-$  no es la misma que la de HA, la solución aparenta alejarse de la ley de Beer a medida que se diluye (19)

#### 4.6.2 PUNTOS ISOSBÉSTICOS

Durante una reacción química una especie absorbente X se convierte en otra especie absorbente Y. Esta clase de transformaciones lleva a un comportamiento característico que se muestra en la figura No.4 en la cual se puede observar una familia de espectros de absorción, a diferentes pH en donde aparecen intersecciones múltiples, llamados puntos isosbéticos. Estos puntos ocurren cuando uno o varios equilibrios, simples y definidos, tienen lugar en disolución y pueden ser dependientes del pH, de la concentración de un componente de la reacción y de la composición del disolvente. (17)

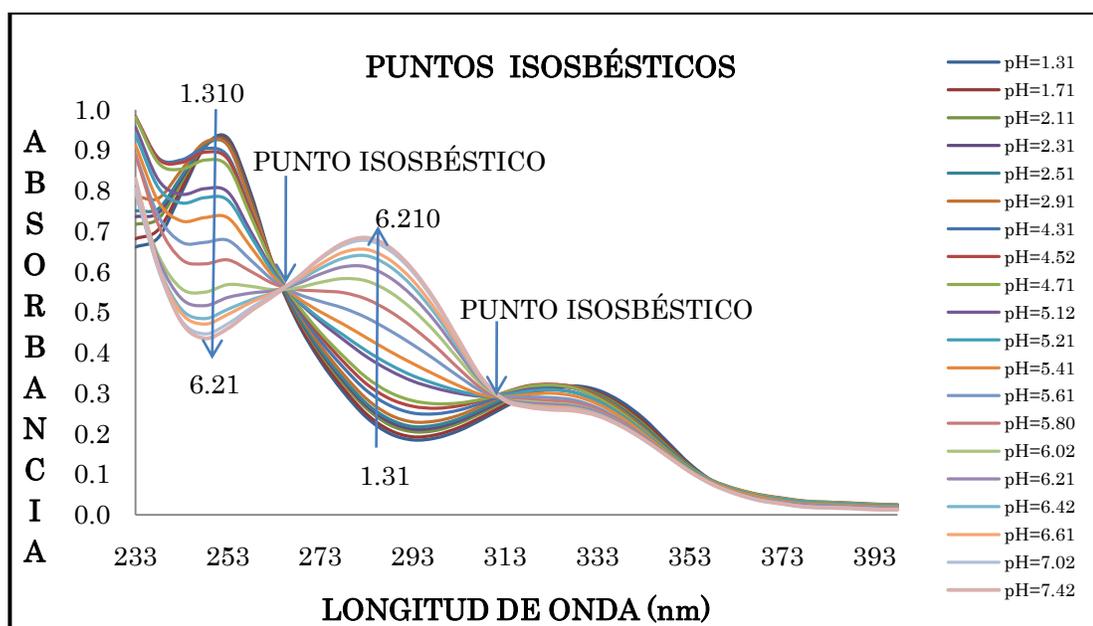


FIGURA No.4 FAMILIA DE ESPECTROS CON UN PUNTO ISOSBÉTICO

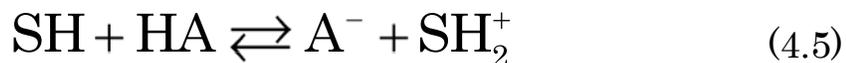
La aparición de dos o más máximos de absorción en un espectro puede ser el resultado de:

- i) más de una transición electrónica de las especies absorbentes
- ii) la existencia de más de una forma de una misma especie
- iii) la existencia de más de una especie absorbente en la solución bajo las condiciones experimentales.

La presencia de un punto isobéptico pone en evidencia que la absorbancia es constante en ese punto, por lo cual se puede concluir que existen dos especies absorbentes principales.

#### 4.6.3 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE ÁCIDEZ EMPLEANDO DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

En mezclas de disolventes la constante de disociación de un compuesto orgánico puede ser escrita de la siguiente forma:



En donde  $\text{SH}_2^+$  denota al protón solvatado, HA y  $\text{A}^-$  se refieren a la forma ácida y básica del compuesto, respectivamente.

La constante de disociación aparente  $psKa$  en el medio puede calcularse mediante la ecuación 4.6 (20)

$$psKa = p[SH_2^+] + \log \frac{A - A_{A^-}}{A_{HA} - A} \quad (4.6)$$

En donde  $A_{A^-}$  es la absorbancia de la especie ionizada en un ambiente básico,  $A_{HA}$  es la absorbancia de la especie ácida en un ambiente ácido y  $A$  es la absorbancia de la mezcla ( $A_{HA} + A_{A^-}$ ) para valores de pH intermedios. Para determinar el valor de  $psKa$  a partir de datos espectrofotométricos es necesario determinar la relación  $(A - A_{A^-})/(A_{HA} - A)$  a diferentes longitudes de onda, en donde las especies ácidas y básicas están lo suficientemente lejanas una de la otra, a partir de los cuales se calcula el valor de  $psKa$  en cada punto. Los valores de  $A_{HA}$  y  $A_{A^-}$  son determinados espectrofotométricamente y la concentración del protón solvatado, en la mezcla de disolventes  $SH_2^+$ , puede determinarse mediante potenciometría.

Los espectros electrónicos son fáciles de medir con alta precisión y baja concentración. Con los métodos convencionales generalmente una parte considerable de la información no se aprovecha. Debido a lo anterior, en la actualidad se han desarrollado varios programas computacionales, que se emplean en la determinación del número de especies y el valor de la constante de estabilidad a partir de datos espectrofotométricos (21).

#### 4.6.4 LIMITACIONES DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

El método espectrofotométrico está basado en la observación de cambios espectrales debido a la protonación o desprotonación, es decir, permite el cálculo de la concentración de las formas del compuesto. Para lo cual las determinaciones deben de ser realizadas en un intervalo superior a 4 unidades de pH. El método presenta también los problemas de traslapamiento y valores extremos de pH. Este método puede proporcionar valores más exactos que otros métodos, aún en compuestos extremadamente ácidos ( $pK_a < 2$ ) ó básicos ( $pK_a > 11$ ). El método espectrofotométrico más ampliamente usando en la determinación de valores de  $pK_a$  es el método basado en las aproximaciones de Flexer , en el que se lleva a cabo la medición de la relación de las concentraciones de la forma ácida a la forma básica  $[C_{HB}/C_{B^-}]$  en función del pH, a partir de los datos espectrofotométricos (6).

## 4.7 MÉTODOS COMPUTACIONALES

Con la finalidad de poder superar las limitaciones de los métodos gráficos, el uso de programas computacionales como TRIANG y SQUAD son una excelente alternativa ya que permiten el refinamiento de constantes de equilibrio en sistemas multicomponentes complicados; además, proporcionan valores con mayor precisión ya que los resultados obtenidos se pueden evaluar mediante parámetros estadísticos como son la desviación estándar y la suma de cuadrados.

En el presente trabajo se emplearon los programas TRIANG para determinar el número de especies absorbentes y SQUAD para refinar las constantes de estabilidad.

### 4.7.1 TRIANG

Es un programa de computación escrito en lenguaje FORTRAN<sup>2</sup> que estima el número de especies que absorben radiación electromagnética en un sistema, a partir de datos de absorbancia a diferentes longitudes de onda y diferente composición química del sistema, considerando un error de transmitancia ( $\Delta T$ ).

---

<sup>2</sup> FORTRAN, del inglés Formula Translating System, es un lenguaje de programación de alto nivel de propósito general, procedimental e imperativo, que está especialmente adaptado al cálculo numérico y a la computación científica. Desarrollado y usado para aplicaciones científicas y de ingeniería, ha estado en uso continuo por más de medio siglo en áreas de cómputo intensivo tales como la predicción numérica del tiempo, análisis de elementos finitos, dinámica de fluidos computacional, física computacional, y química computacional. Es uno de los lenguajes más populares en el área de la computación de alto rendimiento.

La forma de establecer si una especie química que absorbe radiación electromagnética involucra una comparación entre valores de absorbancia y los errores asociados a las mismas; es suponiendo el cumplimiento de la ley de Beer y la ley de aditvidades, de acuerdo al algoritmo que se muestra en la figura 5.

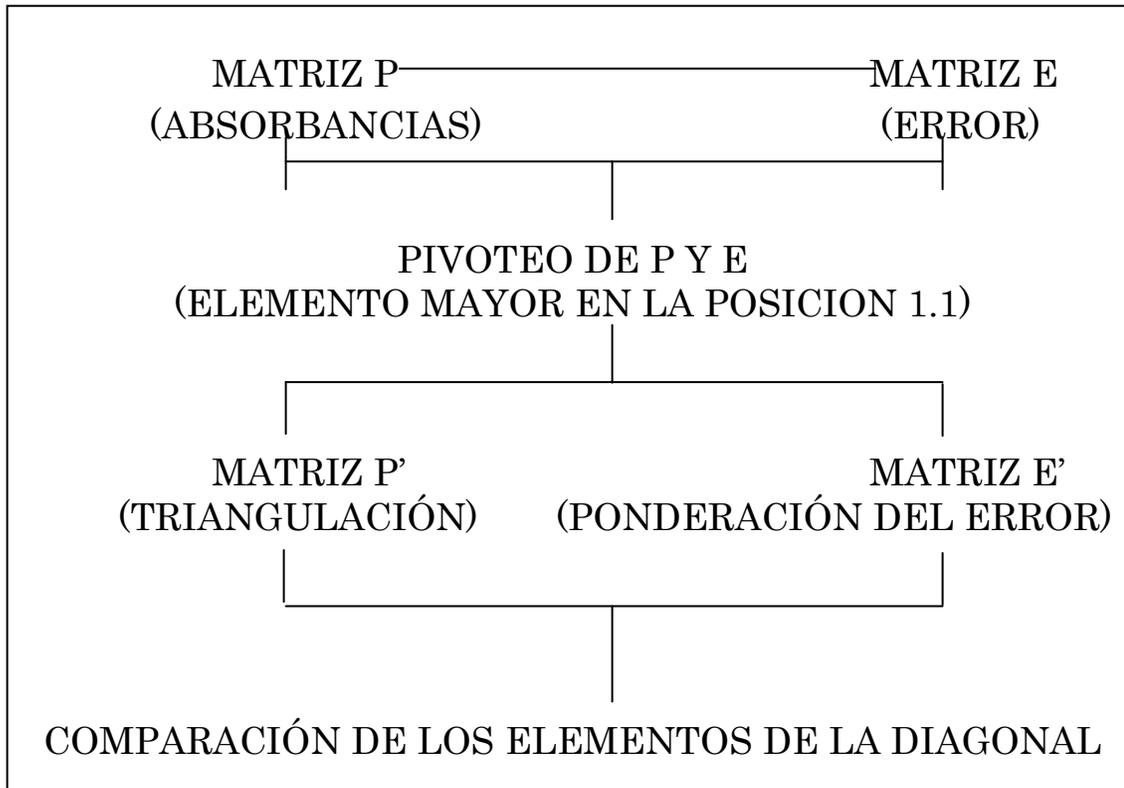


FIGURA No.5 ALGORITMO QUE USA EL PROGRAMA DE TRIANG

TRIANG calcula los elementos de una matriz de error, considerando el valor de  $\Delta T$ , la ecuación del error en absorbancia y la teoría de propagación de error.

Al comparar las diagonales, verifica si el elemento  $E'_{j,j}$  de la matriz del error multiplicado por tres es menor que el elemento  $P'_{j,j}$  de la matriz de absorbancias; entonces se concluye que este elemento diagonal de la matriz de absorbancias es diferente de cero; en caso contrario, se concluye que ese elemento es igual a cero.

El número de especies que absorben en ese sistema se estima como la suma de los elementos  $P'_{j,j}$  diferentes de cero.

El error en las lecturas de transmitancia ( $\Delta T$ ) es igual a:

$$\Delta T = E_{instrumental}^2 + E_{volumétrico}^2 \quad (4.7)$$

El error instrumental es igual al error que se comete en las lecturas de absorbancia y es función del espectrofotómetro empleado.

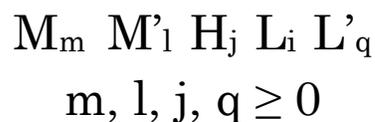
El error volumétrico está asociado fundamentalmente al material utilizado en el experimento para la manipulación y medición de líquidos; por lo tanto es importante estimar el valor de  $\Delta T$  para obtener una mejor información de TRIANG; sin embargo, hay que tener cuidado, ya que esta información no es concluyente.

Para datos espectrofotométricos obtenidos experimentales el valor de  $\Delta T$  debe encontrarse en el intervalo de  $0.003 \leq \Delta T \leq 0.010$ (4)

#### 4.7.2 SQUAD

SQUAD es un programa de computación que está escrito en lenguaje FORTRAN. Este programa está especialmente elaborado para refinar constantes de equilibrio a partir de un modelo químico propuesto, empleando un conjunto de espectros de absorbancia obtenidos a diferentes composiciones químicas del sistema.

El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH. El modelo químico propuesto puede tener especies del tipo:



Donde:

M o M' = ión metálico

H = protón

L, L' = ligando

m, l, j, q = coeficientes estequiométricos

El refinamiento de las constantes se realiza por medio de una minimización de la suma de los residuos de absorbancia cuadráticos - por mínimos cuadrados no lineales- empleando el algoritmo de Gauss-Newton.

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^T - A_{i,k}^E)^2$$

I = Todas las soluciones.

NW = Todas las longitudes de onda.

$A_{i,k}^T$  = Absorbancia calculada por Squad en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

$A_{i,k}^E$  = Absorbancia experimental en la i-ésima solución a la k-ésima longitud de onda.

La resolución de la minimización requiere el cálculo de las absorbancias a la k-ésima longitud de onda en la i-ésima solución.

Para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar por especie y determina la concentración de cada una de las especies empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

Se dice que el programa converge si encuentra una diferencia en la minimización de un ciclo interactivo a otro con una diferencia como máximo de 0.001. Aunque se cumpla lo anterior, no siempre se tiene el mejor refinamiento debido a que se puede tener una convergencia en un mínimo relativo.

Las herramientas estadísticas que SQUAD emplea para determinar si el modelo químico propuesto explica la información experimental alimentada son:

1. Parámetro de correlación (matriz)
2. La desviación estándar sobre los datos de absorbancia ( $\sigma_{\text{datos}}$ ), y de las constantes ( $\sigma_{\text{cte}}$ )
3. La desviación estándar por espectro ( $\sigma_{\text{espectro}}$ )
4. La desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar ( $\sigma_{\text{coef}}$ ).

El análisis estadístico que presenta SQUAD así como los intervalos que propone, dependen en gran medida de la precisión del espectrofotómetro empleado, de la cantidad de datos alimentados y, sobre todo, de la complejidad química del sistema bajo estudio. (4)

### 4.8 DETERMINACIÓN DEL pH

La determinación del pH en mezclas etanol-agua requieren un análisis más cuidadoso que para un sistema acuoso puro. Las propiedades del disolvente que influyen en un equilibrio ácido-base son: su carácter ácido-base, la constante dieléctrica y la constante de autoprotólisis. El equilibrio de autoprotólisis en mezcla de disolventes es mucho más complejo que en disolventes puros. Esta última debido al efecto de la transferencia del protón, se puede presentar como: la transferencia del protón del agua al agua, del disolvente no acuoso al mismo disolvente, del disolvente no acuoso al agua y por último la transferencia del protón del agua al disolvente no acuoso.

#### 4.8.1 DETERMINACIÓN DEL pH EN MEDIO ACUOSO

Para establecer las condiciones experimentales reales se tiene que considerar que el pH de nuestro sistema está dado por la siguiente ecuación:

$$p a_{\text{H}} = -\log m_{\text{H}} \gamma_{\text{H}} \quad (4.9)$$

Donde:

$p a_{\text{H}}$  = logaritmo negativo de la actividad del ión hidronio

$m_{\text{H}}$  = molalidad de los iones hidrógeno

$\gamma_{\text{H}}$  = coeficiente molal de actividad de los iones hidrógeno

A 25°C las diferencias entre molalidad y molaridad en soluciones acuosas diluidas son prácticamente despreciables. En disoluciones acuosas es común emplear concentraciones molares en la ecuación 4.9. Además, el coeficiente de actividad está formulado de tal manera que éste es igual a la unidad a dilución infinita:  $\gamma_{\text{H}}$  tiende a cero. De esta forma  $p a_{\text{H}}$  puede ser calculado a partir del valor de concentración del ión hidronio y del coeficiente de actividad para el mismo.

En disolución diluida el coeficiente de actividad puede ser estimado empleando la ecuación de Debye-Hückel:

$$\log \gamma_{\text{H}} = - \frac{A z^2 I^{1/2}}{1 + B a I^{1/2}} \quad (4.10)$$

Donde:

I = fuerza iónica

z = carga iónica

$a$  = parámetro de tamaño del ion en Å

A = 0.509 y B = 0.329 (para soluciones acuosas a 25°)

El pH operacional se define y se mide operacionalmente en términos de una celda electromotriz (fem) completa, compuesta de un electrodo indicador y uno de referencia; el electrodo indicador más empleado es el de vidrio mientras que el de referencia suele ser el de calomel.

La ecuación de Nernst sirve para representar el potencial de la celda quedando la siguiente ecuación:

$$E = E^{\circ} + 0.05916 \text{ pa}_{\text{H}} - \log a_{\text{Clref}} + E_j \quad (4.11)$$

Definiendo  $E = E^{\circ} - 0.05916 \log a_{\text{Clref}}$ , esto se puede hacer dado que estos valores permanecen constantes para un mismo par de electrodos.

Resolviendo para  $\text{pa}_{\text{H}}$ :

$$\text{pa}_{\text{H}} = \frac{E - E^{\circ} - E_j}{0.05916} \quad (4.12)$$

$E_j$  es el potencial de unión líquida originado entre el puente salino de KCl y la solución de pH a determinar.

Tomando la ecuación 4.12 se puede definir el valor de pH operacional de una muestra desconocida ( $\text{pH}_d$ ) a partir de un pH de una disolución patrón ( $\text{pH}_p$ ).

Asumiendo que para un par de electrodos el valor es aditivo, se tiene que para  $E^{\circ} + E_j$  permanecen constante cuando un estándar es remplazado por una solución desconocida, se obtiene la definición del pH operacional como:

$$\text{pH}_d - \text{pH}_p = \frac{E_d - E_p}{0.05916} \quad (4.13)$$

La mayor aproximación cuando se emplea la definición de pH operacional es que el potencial de unión líquida entre el puente salino y la disolución es el mismo, para el patrón y la disolución desconocida, implicando que los potenciales de unión líquida se cancelan entre ellos. Aunque esto no sucede estrictamente, la composición de la solución debe de ser lo más cercana posible al del estándar para evitar así errores apreciables (6).

#### 4.8.2. MEDICIONES DE pH EN SOLUCIONES NO ACUOSAS.

De la ecuación de Nernst (4.11), a través de que se obtiene el valor para el  $\text{pH}_H$ , dos parámetros se ven modificados cuando cambia la composición del disolvente:

- 1) El valor del potencial estándar de los electrodos empleados en la determinación del pH, sufren una alteración con el cambio del disolvente.
- 2) El coeficiente de actividad, cambia porque la constante dieléctrica del medio modifica los valores de  $A$  y  $B\alpha$  presentes en la ecuación de Debye-Hückel ecuación (4.10)

Tomando en cuenta las anteriores modificaciones, se puede reescribir la ecuación para el cálculo de  $pa_H$ , sólo que ahora será para soluciones no acuosas y se va a expresar como  $pa_H^*$  y los potenciales y los coeficientes de actividad se distinguirán con la letra “s”

$$pa_H = \frac{E - E^\circ}{0.05916} + \log m_{Cl} + \log \gamma_{Cl} \quad (4.14)$$

donde:

$$pa_H^* = -\log m_{H^+} \gamma_{H^+} \quad (4.15)$$

Como es usual, los nuevos coeficientes de actividad se aproximan a la unidad en soluciones muy diluidas del disolvente no acuoso en cuestión, además se asignan los valores de  $pH_s^*$  a las soluciones amortiguadoras en cualquier disolvente anfiprótico y de esta forma poder establecer una escala de  $pH^*$  para cada disolvente anfiprótico así se puede medir el  $pH^*$  operacional en cualquier disolvente. Hay que considerar que es reducida la disposición de amortiguadores en disolventes no acuosos.

Para minimizar el trabajo en el cálculo del  $pH^*$  operacional, debido a que existe una enorme cantidad de disolventes, se estiman los efectos del medio o los coeficientes de actividad de transferencia de los iones hidrógeno  $m\gamma_H$ , en los disolventes para los cuales la correlación de las escalas sea deseable.

Definiendo que:

$$pa_H^* = pa_H - \log_m \gamma_H \quad (4.16)$$

Sí se conoce el valor de  $\log_m \gamma_H$  para un medio determinado, el valor numérico de  $pa_H^*$  para ese medio puede ser expresado en términos de la escala acuosa de  $pa_H$ .

Si se emplea el valor del  $E^\circ$  del electrodo de  $Ag^\circ - AgCl$  en medio acuoso, se tiene una medida de potencial de celda de hidrógeno-plata-cloruro de plata en medio no acuoso. De esta forma la ecuación (4.14) para  $pa_H$  queda:

$$pa_H = \frac{E - {}_{H_2O}E^\circ}{0.05916} + \log m_{Cl} + \log_s \gamma_{Cl} + \log_m \gamma_{Cl} \quad (4.17)$$

El valor de  $pa_H$  que se calcula es el del estándar en medio acuoso, es decir, todos los coeficientes de actividad se vuelven unitarios a dilución infinita en agua. Como las soluciones son diluídas en el medio no acuoso, el coeficiente  $s\gamma_{Cl}$  se aproxima a la unidad, pero el coeficiente del medio, el  $m\gamma_{Cl}$  persiste; por lo tanto, si se considera el valor numérico del coeficiente de transferencia para el ion cloruro,  $m\gamma_{Cl}$ , se podría expresar el valor del  $pa_H$  medido en disolventes no acuosos en una sola escala acuosa.

En un estudio para mezclas metanol-agua y etanol-agua como disolventes, se obtuvieron ciertas correlaciones entre el pH y el  $pa_H^*$  y fueron demostradas sus aplicaciones prácticas en soluciones amortiguadoras en medios alcohol-agua. Las mediciones de pH fueron realizadas con electrodos de vidrio y calomel saturado y estandarizados con amortiguadores acuosos y los valores de la fuerza electromotriz fueron también medidos

con dichas soluciones empleando una celda de hidrógeno (gas) y  $\text{Ag}^\circ - \text{AgCl}$ . A partir de la fuerza electromotriz se obtienen los valores de  $p(a_{\text{H}} \gamma_{\text{Cl}})$ , ya que ellos son iguales a la suma de los dos términos de la parte derecha de la ecuación (4.12). La diferencia de las dos cantidades medidas arroja la siguiente expresión:

$$p\text{H} - p a_{\text{H}} \gamma_{\text{Cl}} = \frac{\Delta E_j}{0.05916} + \log_m \gamma_{\text{Cl}} + \log_s \gamma_{\text{Cl}} \quad (4.18)$$

Posterior al cálculo del efecto salino del coeficiente de actividad para el ion cloruro ( $s\gamma_{\text{Cl}}$ ) partiendo de la ecuación de Debye-Hückel, Bates, Paabo y Robinson aislaron los términos desconocidos

$$\frac{\Delta E_j}{0.05916} + \log_m \gamma_{\text{Cl}} \quad (4.19)$$

a partir de los cuales ellos calcularon la cantidad relacionada:

$$\frac{\Delta E_j}{0.05916} + \log_m \gamma_{\text{Cl}} \stackrel{\delta}{=} 3 \quad (4.20)$$

Restando la ecuación (4.16) y combinándola con la ecuación (4.13) se tiene que:

$$p a_{\text{H}}^* = p\text{H}_{\text{oper}} - \delta \quad (4.21)$$

---

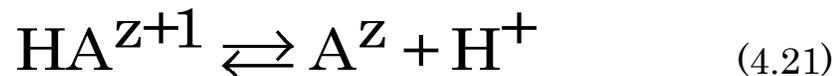
<sup>3</sup> El cálculo hace uso del hecho de que  $\log m\gamma_{\text{H}} = \log m\gamma_{\text{HCl}} - \log m\gamma_{\text{Cl}}$ . Los valores de  $\log m\gamma_{\text{HCl}}$  para sistemas  $\text{H}_2\text{O}$ -Alcohol son conocidos (22)

Para cada medio etanol-agua, se ha estudiado los valores de  $\delta$ , los cuales son constantes e independientes del pH; así que, la interpretación de los valores operacionales de pH a partir de la ecuación (4.21) es posible (6).

## 4.9 PROPIEDADES ÁCIDO BASE

### 4.9.1 TEORÍA DE BRÖNSTED Y LÖWRY

Según Brönsted y Löwry, un ácido es una sustancia capaz de donar un protón y una base, es aquella sustancia que cuenta con la capacidad de aceptar un protón, de modo que se puede representar en el siguiente equilibrio:

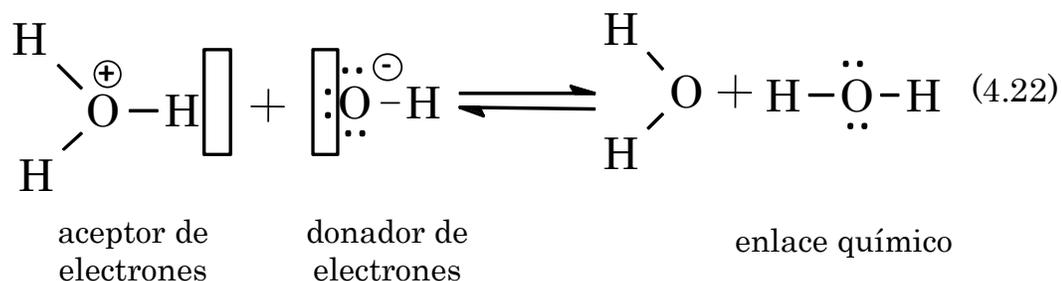


Donde  $z=0, \pm 1, \dots$

En disolución el protón  $\text{H}^+$  no puede estar aislado. La reacción ácido-base se lleva a cabo si se encuentra presente una base que tenga una mayor afinidad por el protón que la afinidad que la base  $\text{A}^z$  tiene por éste. La mayoría de los disolventes tienen características ácido-base, y la fuerza de cada uno dependerá del medio en el cual estén disueltos.

### 4.9.2 TEORÍA DE ÁCIDOS Y BASES DE LEWIS

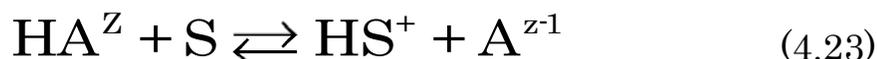
Para Lewis, un ácido es una molécula capaz de aceptar un par de electrones y la base es la molécula que tiene la capacidad de donar un par de electrones. La definición de Lewis amplía los conceptos de ácido base a especies que no necesariamente tienen  $H^+$  reactivos. Una de las aplicaciones más simples de esta clasificación es el caso de la reacción entre  $H_3O^+$  y  $OH^-$  en solución acuoso



El par de electrones donado por el  $OH^-$  es aceptado por el  $H^+$  (procedente de la disociación de  $H_3O^+$ ), formando de este modo un enlace. Las definiciones de Lewis pueden aplicarse a reacciones que guardan poco parecido con las reacciones ácido-base en medio acuoso. (19)

### 4.9.3 EFECTO DEL DISOLVENTE EN LAS PROPIEDADES ÁCIDO-BASE

La disociación de un ácido  $HA^z$ , que cuente con una carga  $z$ , y que se encuentre en un disolvente  $S$  capaz de aceptar iones hidrógeno, presenta el siguiente equilibrio:



Para que se dé la disociación de un ácido en un disolvente existen varios procesos, que fueron establecidos por Izmailov (23). La dilución de un ácido ( $HA^z$ ) en un disolvente ( $S$ ), consiste en una solvatación parcial del ácido  $HA^z$  por el disolvente  $S$ , permitiendo una formación transitoria del par iónico  $HS^+A^{z-1}$ . De la completa dilución del ácido, resulta una total solvatación de estas moléculas y la ionización de algunas de éstas por la transferencia del protón del ácido al disolvente ( $S$ ).

La cantidad de moléculas que se separarán para dar la forma ionizada del ácido y el disolvente protonado, dependerá de la constante dieléctrica del disolvente ( $\epsilon_s$ ) y de las propiedades ácido base inherentes del propio ácido. Se puede asumir un ciclo de Born entre el disolvente y el vacío (en donde no existe la solvatación de las moléculas por el disolvente) para las diferentes especies que participan en el equilibrio a partir de esto, se puede deducir la ecuación general que relaciona el  $pK_a$  del ácido en el disolvente  $S$   ${}_s pK$  con los factores principales que contribuyen para que su valor sea calculado.

Debido a que la ecuación resultante es algo complicada, se le realizan algunas simplificaciones con fines prácticos y son las siguientes:

- El coeficiente de actividad para el disolvente tiene que ser igual a la unidad (sólo se cumple en disoluciones diluidas)
- Las concentraciones de los pares iónicos ( $HS^+A^{z-1}$ ) y la especie ácida sin solvatar son despreciables (lo cual solo se cumple en disoluciones diluidas de disolventes con moderada o alta constante dieléctrica, como son las mezclas de etanol agua).
- Los valores de la energía libre de transferencia  $\Delta G_T^0$  de las dos especies ácido-base  $HA^z$  y  $A^{z-1}$  entre el disolvente y el vacío son similares
- El radio ( $r$ ) de todos los iones solvatados ( $HA^z$ ,  $A^{z-1}$ ,  $HS^+$ ) es de igual tamaño (24)

Tomando en cuentas las simplificaciones antes mencionadas se obtiene la siguiente expresión:

$${}^S_S pK_a = {}^{vac}_{vac} pK_{HA}^0 - {}^{vac}_{vac} pK_{HS^+}^0 - \frac{e(z-1)}{2.303({}^S\varepsilon)rkT} - \frac{\Sigma_S G_{solv}^0}{2.303RT} \quad (4.24)$$

Al medir el  $pK/pH$  en medios no acuosos o en mezclas de disolventes, el estado estándar puede ser tomado como igual a uno en el medio en el cual las mediciones son realizadas (S o vac) o referidas al agua (w). El estado estándar se refiere, se indica por el sub índice del lado izquierdo de la propiedad a considerar.

La ecuación (4.24) muestra los cuatro factores más importantes que afectan a la acidez de HA en el disolvente S.

Donde  ${}^S_S pK_a = \frac{{}^{vac} pK_{HA}^0}{{}^{vac} pK_{HS^+}^0}$  son las constantes intrínsecas de disociación de la sustancia y del disolvente protonado en el vacío, en el que no existe efectos de solvatación, el término  $\frac{{}^{vac} pK_{HS^+}^0}{{}^{vac} pK_{HA}^0}$  es el valor intrínseco de la basicidad del disolvente. A mayor valor intrínseco del disolvente protonado la basicidad del disolvente se reduce, y en consecuencia el valor de la constante de disociación del ácido  $HA^Z$  se reduce en el disolvente. El término  $e(z-1)/2.303 {}^S\varepsilon rkT$  representa las interacciones electrostáticas entre los iones presentes en la dilución, las cuales dependen de:  $Z$  la carga de la especie ácida  $HA^Z$ , de la constante dieléctrica del medio  ${}^S\varepsilon$  y del radio de los iones  $r$ . En esta ecuación “ $e$ ” representa la carga del electrón y  $kT$  es la energía de agitación térmica (25,26)

Cada término dependerá del valor de  $Z$ . Si se trata de una base protonada del tipo  $HA^+$ ,  $Z=1$ , este término (el tercero) es nulo, debido a que el número de cargas se mantiene constante. Un cambio en la constante dieléctrica del medio, manteniendo las demás interacciones de igual manera, no debe alterar el valor de la constante dieléctrica del medio.

Si  $Z < 1$ , como sería el caso de un especie neutra HA con un valor de  $Z=0$ , un incremento en el valor de la constante dieléctrica del medio aumenta la acidez del ácido. El último término de la ecuación (4.24)  $\frac{\sum_S G_{solv}^0}{2.303RT}$ , cuantifica las energías específicas de solvatación de las diferentes especies que están presentes en el medio (por ejemplo, los enlaces de hidrógeno).

Para una base  $A^{Z-1}$  se puede emplear la ecuación anterior para determinar su basicidad ya que ésta se encuentra relacionada directamente con la acidez de su ácido conjugado. Esta misma ecuación puede ser simplificada en varias formas. Si un ácido está solvatado en disolventes de basicidad muy parecida (mismo valor de  $\frac{\text{vac}}{\text{vac}} \text{pK}_{\text{HS}^+}^0$ ) y con los mismos efectos de solvatación hacia el soluto, la ecuación se puede establecer en una relación lineal entre los valores de  ${}^S \text{p}K$  y el inverso de la constante dieléctrica del medio ( ${}^S \epsilon$ ), lo cual sólo es posible en un caso hipotético, debido a que en la realidad no existen dos disolventes con las mismas características e interacciones hacia el soluto.

Al ser el agua (w) uno de los disolventes más empleados, la relación que se obtiene es la siguiente:

$${}^S \text{pKa} = {}^w \text{pK}_{\text{HA}}^0 - \frac{\text{vac}}{\text{vac}} \text{pK}_{\text{HS}^+}^0 + \frac{\text{vac}}{\text{vac}} \text{pK}_{\text{H}_3\text{O}^+}^0 - \frac{e(z-1)}{2.303r(kT)} \left( \frac{1}{{}^S \epsilon} - \frac{1}{{}^w \epsilon} \right) - \frac{\Sigma_{\text{S}}^S \text{G}_{\text{solv}}^0 - \Sigma_{\text{w}}^w \text{G}_{\text{solv}}^0}{2.303RT}$$

(4.25)

Se considera que el radio iónico  $r$  permanece constante cuando el ácido se transfiere del agua (w) al disolvente (S) y viceversa.

Para ácidos con aproximadamente la misma carga y radio, los cuales además presentan los mismos efectos de solvatación, la ecuación anterior muestra que sus términos en agua y en el disolvente S difieren en sólo una constante. Las dos primeras condiciones son muy comunes, pero es muy difícil encontrar a dos moléculas que presenten las mismas interacciones con el disolvente.

#### 4.9.4. SOLVATACIÓN PREFERENCIAL EN MEZCLA DE DISOLVENTES

La solvatación de un soluto en una mezcla de disolventes es mucho más compleja que la solvatación en un disolvente puro por lo que existen diversas teorías y modelos para este proceso (27,28), aunque todas llegan a un punto en común, que es cuando en un soluto se disuelve en una mezcla de disolventes, el efecto de la solvatación específica determina la proporción de los disolventes que están presentes en la esfera de solvatación del soluto y es diferente a la del resto de la disolución. El soluto interactúa con mayor fuerza con uno o más de los disolventes y es solvatado preferencialmente por estos disolventes, de manera que la solvatación preferencial es atribuida al exceso o la deficiencia de uno de los disolventes (26,29-32). Los valores de  $pK_a$ , dependen de la composición y de las propiedades de estos disolventes en la esfera de solvatación, por lo que éstos son muy sensibles a la solvatación preferencial.

El valor de  $pK_a$  de un soluto guarda estrecha relación con el medio en el cual se encuentra disuelto. En principio, esto depende de las propiedades de cada disolvente y normalmente se observa que el  $pK_a$  de un soluto presenta un comportamiento lineal dentro de un intervalo de composición limitado de algunos de los disolventes. Las teorías desarrolladas en este sentido tratan de explicar la influencia del disolvente en dichos valores. Aunque a la fecha estas teorías no son del todo satisfactorias, provocando el establecimiento de diversas escalas empíricas de polaridad, las cuales han tratado de medir los efectos a través de parámetros obtenidos experimentalmente.

#### 4.9.5 PARÁMETROS EMPÍRICOS DE POLARIDAD

Aunque se ha intentado explicar las interacciones soluto-disolvente lo que se ha observado es que un cambio del medio provoca alteraciones en:

- la dirección
- La extensión del equilibrio químico
- El orden
- La cinética y
- El comportamiento espectroscópico

Lo que pone de manifiesto el papel tan importante de los disolventes en la evolución de los procesos químicos.

Las constantes físicas de los disolventes como son: el punto de fusión, el punto de ebullición, el índice de refracción, la constante dieléctrica, etc., eran los que se tomaban en cuenta para describirlos. Sin embargo, se encontraban inconsistencias en el comportamiento de los solutos en los disolventes. Esto puso de manifiesto que los disolventes no podían ser considerados como sistemas macroscópicos continuos, sino más bien como estructuras dinámicas compuestas de moléculas que interactúan de manera diferente entre ellas y con los diferentes solutos. La constante dieléctrica al ser un parámetro macroscópico puede utilizarse para describir el comportamiento global del disolvente, pero es incapaz de proporcionar una adecuada descripción de la esfera de solvatación alrededor del soluto. Esta situación generó la necesidad de establecer nuevos parámetros para la descripción cuantitativa de las interacciones entre soluto disolvente, que involucran escalas empíricas de polaridad (33).

Para establecer estas escalas se eligen procesos sensibles a los disolventes en los que se involucra un soluto de referencia. El soluto debe incorporar la mayor diversidad de interacciones específicas soluto-disolvente dentro de la esfera de solvatación. Las interacciones son determinadas empíricamente a través de índices numéricos que nos dan una medida cuantitativa y comparativa de estas interacciones, estos índices son denominados parámetros empíricos de polaridad y dan lugar a las diferentes escalas empíricas (34)

Existen escalas uniparamétricas que tratan de incorporar todas las interacciones entre soluto y el disolventes en un parámetro único. En contraste, las escalas multiparamétricas asocian cada tipo de interacción soluto-disolvente con un parámetro propio y todos éstos conjuntos proporcionan una imagen global del disolvente. Las aproximaciones uni y multiparamétricas aportan información complementaria y orientada al conocimiento de la magnitud y naturaleza de las interacciones entre el soluto y el disolvente.

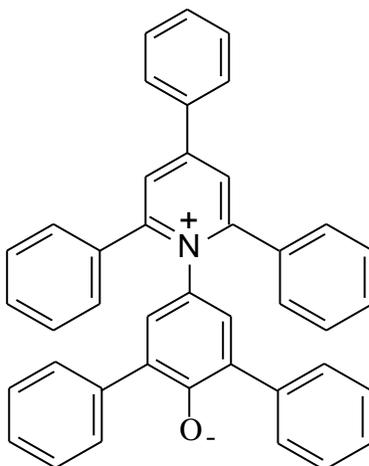
Entre las escalas empíricas de polaridad uniparamétricas y multiparamétricas más empleadas, se encuentran la escala  $E_T$  30 o  $E_T^N$  y los parámetros de Kamlet-Taft ( $\alpha, \beta, \pi^*$ ).

Estos parámetros pueden ser medidos a través de desplazamientos espectrales de sus bandas de absorción, que algunos solventes empleados como referencia presentan. Debido a la importancia, que en años recientes estos grupos de parámetros han presentado, se hace aquí una breve descripción de cada uno de éstos. Para mayor profundidad en el tema el lector puede consultar las referencias correspondientes (34,35)

#### 4.9.5.1 PARAMÉTRO $E_T^{30}$ o $E_T^N$

Dimeroth y Reichardt propusieron un parámetro de polaridad del disolvente que denomina  $E_T^{30}$ . Este parámetro mide principalmente la acidez de Lewis.

El  $E_T^{30}$  está basado en la energía de transición para la banda de absorción solvatocrómica de longitud de onda más larga del colorante betaína fenóxido N piridonio



**FIGURA No.6 ESTRUCTURA DEL COLORANTE BETAÍNA FENÓXIDO N PIRIDONIO**

De acuerdo con la ecuación:

$$E_T / (\text{Kcal.mol}) = h \cdot c \cdot \nu \cdot N_A = 2.859 \cdot 10^{-3} \cdot \nu / \text{cm}^{-1} \equiv z$$

El valor  $E_T^{30}$  para un disolvente es definido como la energía de transición del colorante betaína disuelto en este disolvente, medido en Kcal/mol (36).

La ventaja de esta aproximación radica en que la banda de absorción solvatocrómica se encuentra a longitudes de onda más grandes para este colorante betaína fenóxido N piridonio que para el colorante de Kosowers (Yoduro de 1-etil-4-metoxicarbonilpiridonio), lo que genera un intervalo extraordinariamente grande para el comportamiento solvatocrómico: desde  $\lambda=810\text{nm}$ ,  $E_T 30 = 35.3 \text{ kcal/mol}$ , para el difenil eter, hasta  $\lambda=453\text{nm}$ ,  $E_T 30 = 63.1 \text{ kcal/mol}$  para el agua. Como la mayor parte de este intervalo solvatocrómico se encuentra en la región visible del espectro, es incluso posible hacer una estimación visual de la polaridad del disolvente. A causa del desplazamiento tan grande de la banda de absorción solvatocrómica, los valores de  $E_T 30$  proveen una excelente y sensible caracterización de la polaridad del disolvente. A un mayor valor de  $E_T 30$ , corresponde mayor polaridad del disolvente.

Para manejar un parámetro adimensional equivalente a  $E_T 30$ , se ha definido un parámetro normalizado:

$$E_T^N = (E_T 30_{\text{disolvente}} - E_T 30_{\text{TMS}}) / (E_T 30_{\text{agua}} - E_T 30_{\text{TMS}}) = (E_T 30_{\text{disolvente}} - 30.7) / 32.7$$

Donde TMS= tetrametilsilano

Cuando en el sistema no existen interacciones específicas, en el parámetro  $E_T 30$  predomina la influencia de la constante dieléctrica del medio (6). En algunos casos el parámetro  $E_T 30$  como único en correlaciones de procesos que dependen del disolvente, se ha aplicado exitosamente, lo que significa que la determinación de este parámetro comprende una gran gama de interacciones soluto-disolvente. Los valores de  $E_T 30$

representan una medida combinada de dipolaridad/polarizabilidad\* y de la acidez o capacidad donadora del puente de hidrógeno del disolvente (HBD) o acidez de Lewis. Siendo esta última propiedad significativa sólo para los disolventes HBD. Por lo que este parámetro es especialmente útil cuando ocurren interacciones de puente de hidrógeno.

Debido a que en la betaína, la carga negativa del átomo de oxígeno fenólico está localizada, este colorante, además de las interacciones no específicas, preferentemente mide la acidez específica de los disolventes orgánicos. Al encontrarse deslocalizada la carga positiva del piridinio, la basicidad de Lewis no puede ser medida por esta molécula. Es por eso que si la basicidad del sistema bajo estudio es relevante, tendrán que ser tomados en cuenta parámetros que sean sensibles a esta propiedad como el parámetro  $B_{KT}$ .

### 4.10 EXTRAPOLACIÓN DE YASHUDA-SHEDLOVISKY

Con base a el modelo electrostático de Born y en la teoría de asociación de iones de Bjerrum, Yasuda y Shedlovsky derivaron independientemente una correlación en donde una gráfica de  $pK_a + \log (H_2O)$  versus  $A/\epsilon + B$  produce una línea recta, donde  $(H_2O)$  denota la concentración del agua y  $\epsilon$  es el valor de la constante dieléctrica de la mezcla.

---

\*El término polarizabilidad se refiere a la capacidad de la nube electrónica de un ion o molécula a deformarse bajo la influencia de cargas cercanas o dipolos cercanos. La deformación de la nube electrónica crea un dipolo en el ion o molécula.

Los términos A y B representan la pendiente y la ordenada de la gráfica respectivamente.

Se ha demostrado que cuando se emplean mezclas de disolventes (orgánico-acuoso), en donde la constante de la mezcla es superior a 50, la extrapolación a agua pura es lineal y conduce a valores de  $pK_a$  relativamente correctos (7,8).

La utilidad de esta función lineal es:

- a) La posibilidad de extrapolar en caso de que la molécula sea insoluble en agua.
- b) Predecir el valor de  $pK_a$  en diferentes solventes orgánicos cuya constante dieléctrica se conozca.
- c) Predecir el valor de  $pK_a$  de mezclas no realizadas experimentalmente.

# 5. MATERIALES, EQUIPO DE LABORATORIO Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

## 5.1 REACTIVOS

Ácido Clorhídrico concentrado. Destilado isotérmicamente

Hidróxido de Potasio 0.1 N

Etanol Absoluto Reactivo Baker ACS

Agua destilada y desionizada

Nitrógeno

Bufer estándar de 4.01, 7.00 y 10.00

*Clonixinato de lisina* lote 0502097001

### 5.1.1 EQUIPO

Espectrofotómetro UV/Vis PERKIN ELMER. Lamda 18

2 Celdas de cuarzo de 1cm

Balanza Analítica (Mettler-Toledo AB204)

Baño con termostato (Polyscience)

Celdas para el baño con tapa

pH-metro Mettler Toledo (Mp-230)

Electrodo (Thermo Scientific Ross combination pH 8102 BN Ross)

Barra magnética

Parrilla eléctrica

Pipetas Volumétricas de 1,2,3,5,10,15 y 20 mL

Pipetas graduadas de 0.5. 5 y 10 mL

Piseta

Gradilla

Matraces Aforados de 10, 25, 50 y 100 mL

Vasos de precipitado de 250 mL

Termómetro

## 5.2 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Los espectros se trazaron en función del pH en un intervalo de longitud de 220 a 400 nm en agua y en mezclas etanol-agua de 10, 20, 30 y 40 por ciento en volumen de etanol. Se partió de una solución ácida del *clonixinato de lisina* de una concentración de  $4.90 \times 10^{-5}M$  y de pH inicial de 0.51 a la que se le fueron adicionando el volumen necesario de una solución básica de CLX-Lys  $4.90 \times 10^{-5}M$  y pH= 12.92, para aumentar 0.2 unidades de pH. De esta manera la concentración se mantiene constante, sin que sea necesaria una corrección por dilución a pesar de ir en aumento el volumen de la muestra. La temperatura se mantuvo constante durante toda la experimentación a 25°C empleando un baño con termostato. Para la preparación de las soluciones se utilizó agua desionizada, KOH 0.1M y HCL destilado isotérmicamente.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA LISINA EN MEDIO ACUOSO

Como se puede observar en la Figura No.1, la estructura molecular del *clonixinato de lisina* CLX-Lys está formada por dos partes, una que corresponde al *ácido clonixínico* H<sub>2</sub>CLX Fig. No.7 y al aminoácido *lisina* L-Lys Fig. No. 8

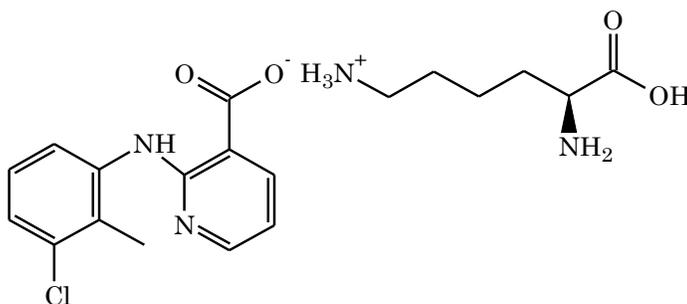


FIGURA No. 1 ESTRUCTURA MOLECULAR DEL *CLONIXINATO DE LISINA* (CLX-Lys)

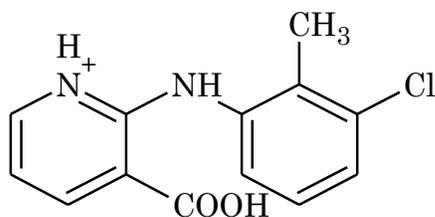


FIGURA No. 7. ESTRUCTURA MOLÉCULAR DEL  
*ÁCIDO CLONIXÍNICO*

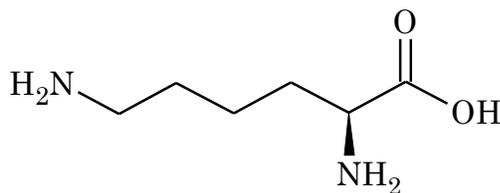
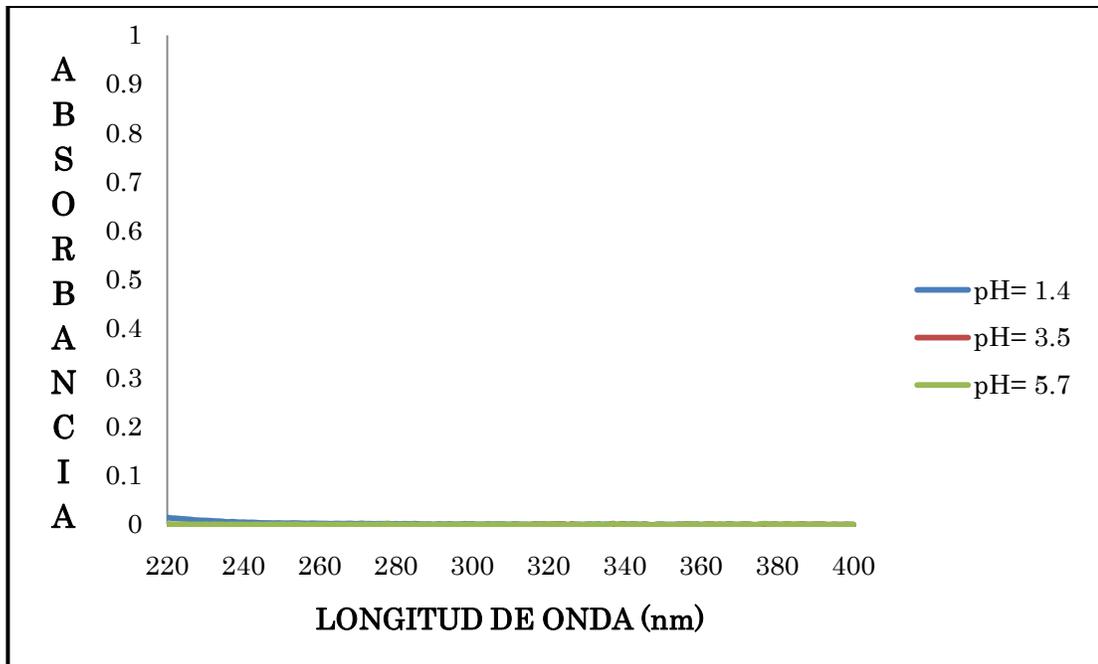


FIGURA No. 8 ESTRUCTURA MOLÉCULAR DEL  
*AMINOÁCIDO L-LYS*

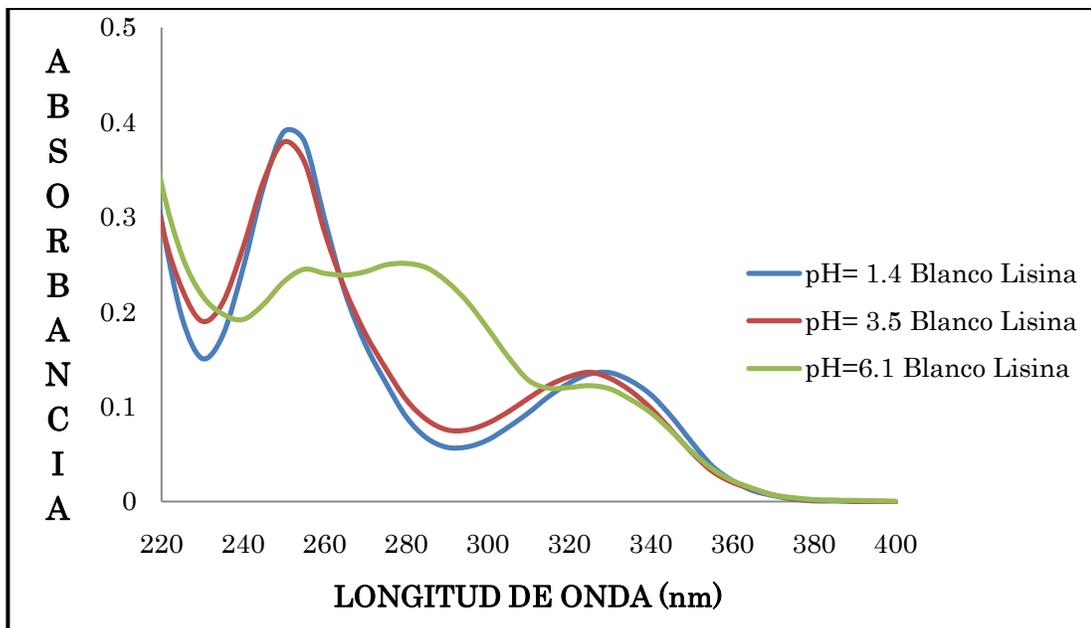
Los espectros de absorción obtenidos en el presente estudio, sólo son atribuibles al *ácido clonixínico* H<sub>2</sub>CLX, ya que la *lisina* no presenta absorbancia en el intervalo de longitud de onda de trabajo. Lo anterior se puede constatar con la gráfica No. 1 en donde se observa que los espectros de absorción de un estándar de *lisina* no presentan absorbancia en medio acuoso, a tres diferentes pH's en un intervalo de longitud de onda de 220-400 nm a 25°C de temperatura y a una concentración 4.89x10<sup>-5</sup>M y (condiciones similares a las utilizadas para el CLX-Lys) sólo se puede observar una línea recta a una absorbancia de cero en todo el intervalo de longitud de onda.



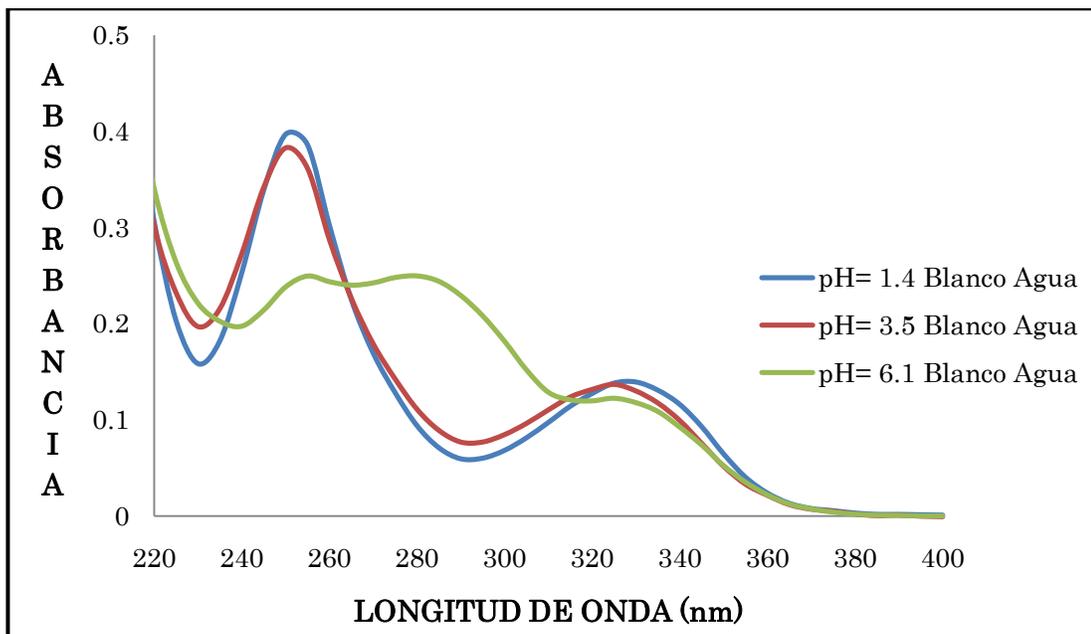
**GRÁFICA No.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LA L-LYS EN MEDIO ACUOSO EN FUNCIÓN DEL pH A UNA  $C_0= 4.89 \times 10^{-5} \text{ M}$   $T=25^\circ$**

De manera adicional, para demostrar que la lisina en realidad no presenta absorbancia bajo las condiciones de estudio, se realizaron los espectros del CLX-Lys utilizando blanco lisina gráfica No.2 y blanco agua gráfica No.3 a tres pH's diferentes elegidos dentro del intervalo de pH's de trabajo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



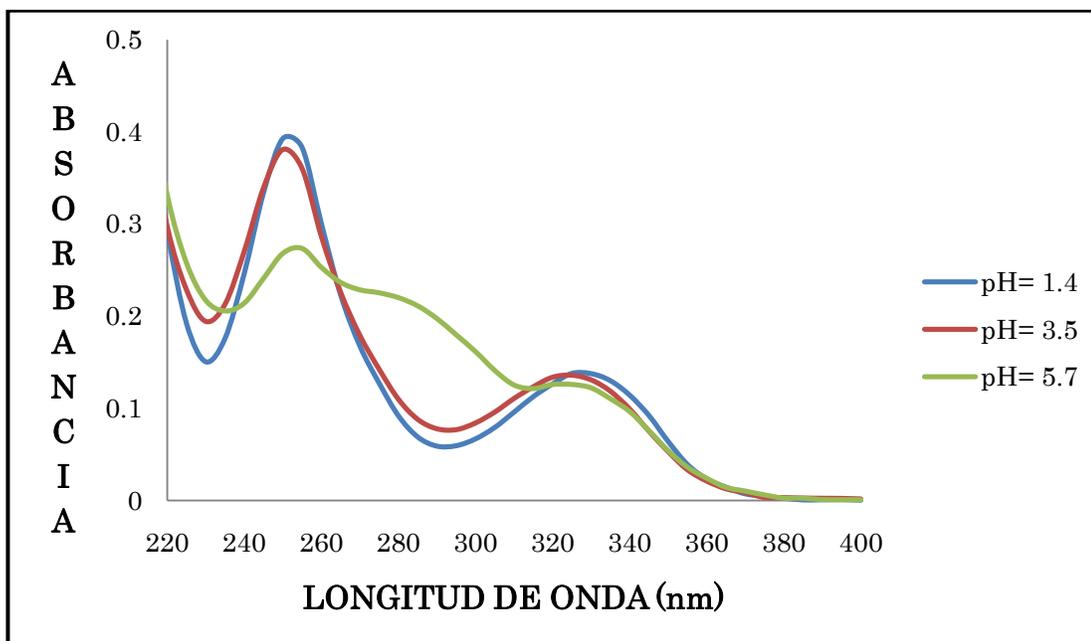
GRÁFICA No.2 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL CLX-Lys EN SOLUCIÓN ACUOSA EN FUNCIÓN DEL pH A UNA  $C_0 = 2.45 \times 10^{-5} M$  USANDO BLANCO DE LISINA



GRÁFICA No.3 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL CLX-Lys EN SOLUCIÓN ACUOSA EN FUNCIÓN DEL pH A UNA  $C_0 = 2.45 \times 10^{-5} M$  USANDO BLANCO AGUA

Como se puede ver en las gráficas 2 y 3 se presenta el mismo comportamiento de las bandas de los espectros del CLX-Lys en ambas gráficas, independientemente del tipo de blanco que se utilice, son semejantes; las dos gráficas presentan tres bandas de absorción de comportamiento similar. Por lo que el blanco puede ser agua o *lisina* y la absorbancia siempre corresponderá al *ácido clonixínico* en estas condiciones. Por lo que el uso del agua como blanco para el desarrollo experimental, es adecuado.

Asimismo, para demostrar de manera contundente que ni la lisina ni el cambio de pH interfieren en los espectros de absorbancia del CLX-Lys y por otra parte, que la absorbancia sólo se puede adjudicar al *ácido clonixínico*, se corrieron espectros de CLX-Lys usando blanco *lisina* al mismo pH que la muestra.



GRÁFICA No.4 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL CLX-Lys EN MEDIO ACUOSO EN FUNCIÓN DEL pH A UNA  $C_0 = 2.45 \times 10^{-5} M$  USANDO BLANCO LISINA AL MISMO pH QUE LA MUESTRA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

Los espectros de las gráficas No.2, 3 y 4 son parecidos y en la tabla No. 3 muestran las longitudes de onda de máxima absorción para las especies presentes a tres diferentes pH's, en los cuales no existen muchas diferencias.

**TABLA No.3 LONGITUD MÁXIMA DE ABSORCIÓN DEL CLX-Lys CON DIFERENTES pH's Y BLANCOS**

BLANCO UTILIZADO	pH= 1.4		pH= 3.5		pH= 6.1		
	$\lambda_{\text{máx1}}$	$\lambda_{\text{max2}}$	$\lambda_{\text{máx1}}$	$\lambda_{\text{max2}}$	$\lambda_{\text{máx1}}$	$\lambda_{\text{max2}}$	$\lambda_{\text{max3}}$
LISINA	250	330	250	325	255	280	325
AGUA	250	330	250	325	255	280	325
LISINA AL MISMO pH QUE LA MUESTRA	252	325	250	325	255	-----	325

## 6.2 CORRECCIÓN DE LOS VALORES DE pH

Los valores de  $pK_a$  fueron determinados en solución acuosa y mezclas etanol-agua empleando el electrodo de vidrio el cual comúnmente se usa para la determinación de valores de pH en medio acuoso, por lo que para las mezclas etanol agua los valores de pH tuvieron que ser corregidos

En el presente trabajo esto fue posible mediante la siguiente ecuación; la cual ya se explicó en el marco teórico como se deduce.

$$pH^* = pH_{\text{operacional}} - \delta$$

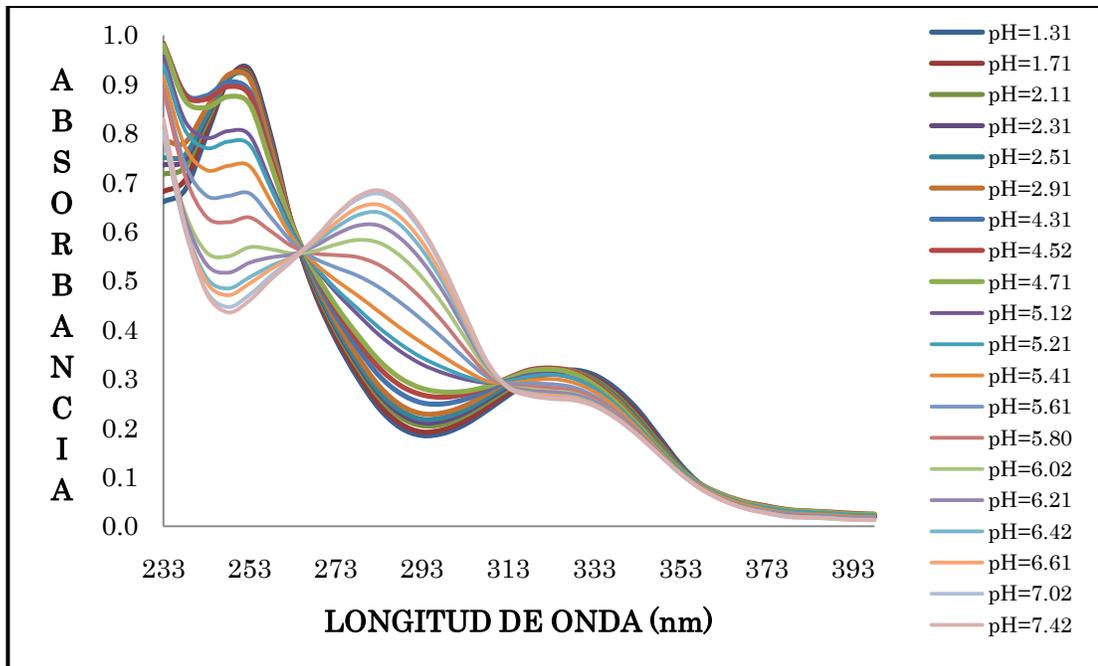
Los valores de  $\delta$  se encuentran en la literatura para mezclas etanol agua (19). Los valores de  $\delta$  para los porcentajes de mezclas del presente trabajo fueron interpolados mediante el empleo de ecuaciones que se establecieron para tal fin. Dichos valores, así como las ecuaciones, se encuentran en el Anexo I

### 6.3 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL CLX-Lys EN SOLUCIÓN ACUOSA Y MEZCLAS ETANOL-AGUA

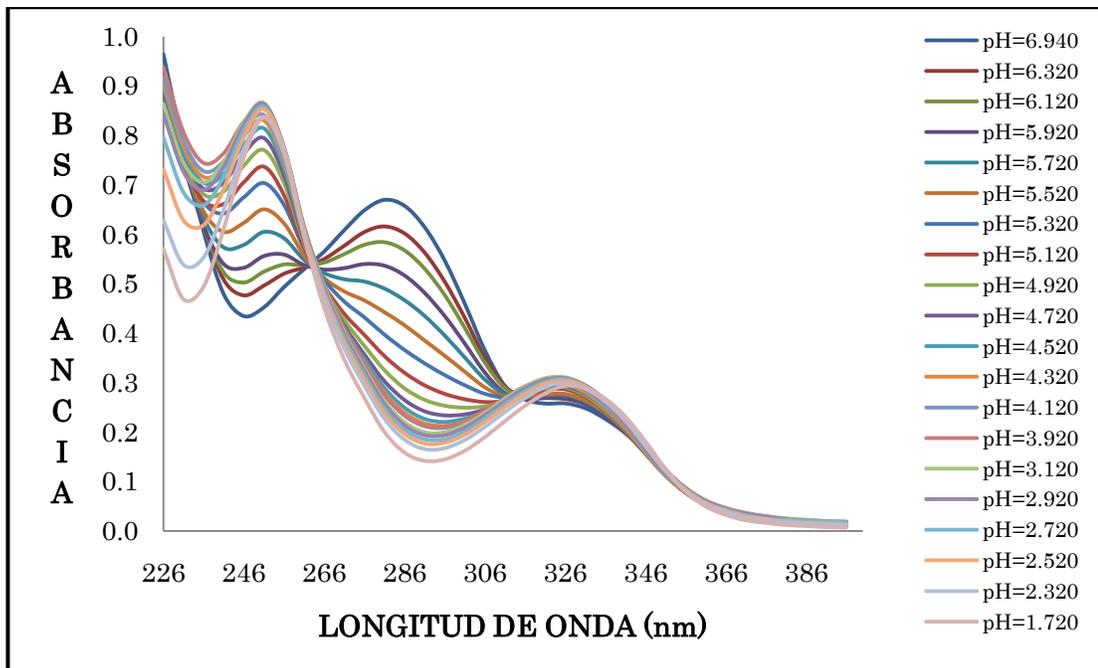
En las siguientes páginas se encuentran las gráficas de los espectros de absorción para el CLX-Lys en medio acuoso y mezclas etanol agua (10, 20, 30 y 40 % v/v) en un intervalo de  $\lambda = 226-393$  nm, a una concentración de  $4.910 \times 10^{-5} M$ , y a una temperatura de  $25^{\circ}C$ .

La gráfica No. 5 muestra la familia de espectros obtenidos en solución acuosa de medios ácidos a básicos y la gráfica No.6 la familia obtenida a partir de medios básicos a ácidos. Estos dos conjuntos presentan el mismo comportamiento, por lo que se infiere que los equilibrios ácido-base involucrados, no dependen del sentido de la reacción. El mismo comportamiento se observó en las diferentes mezclas etanol-agua cuando la reacción se llevaba de ácido a base y viceversa. Las gráficas de base a ácido se encuentran en el Anexo II.

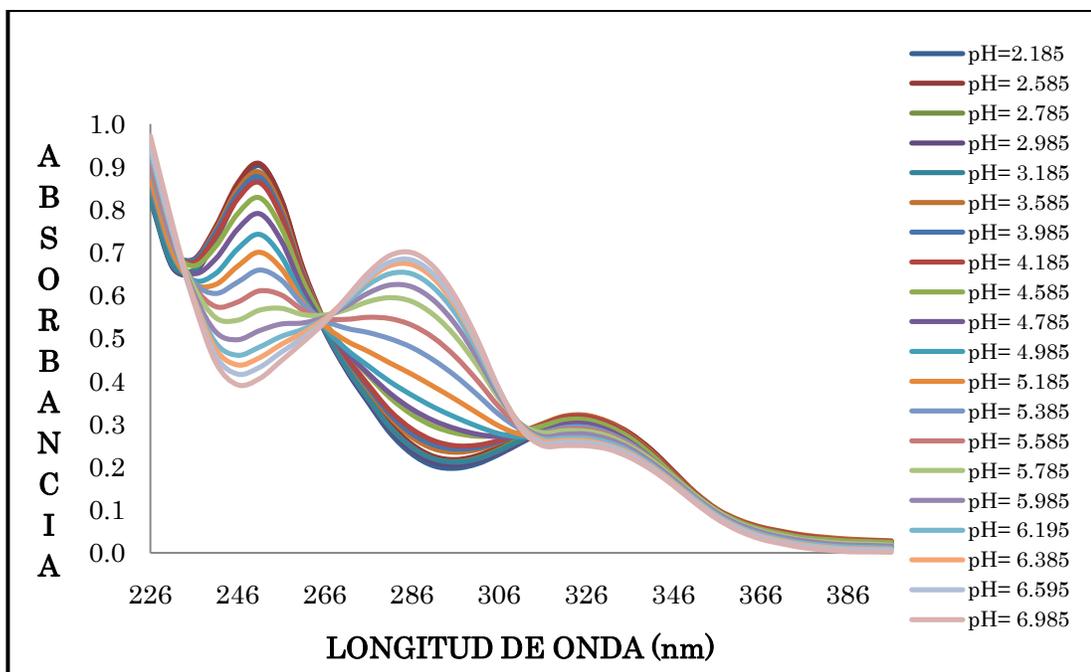
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



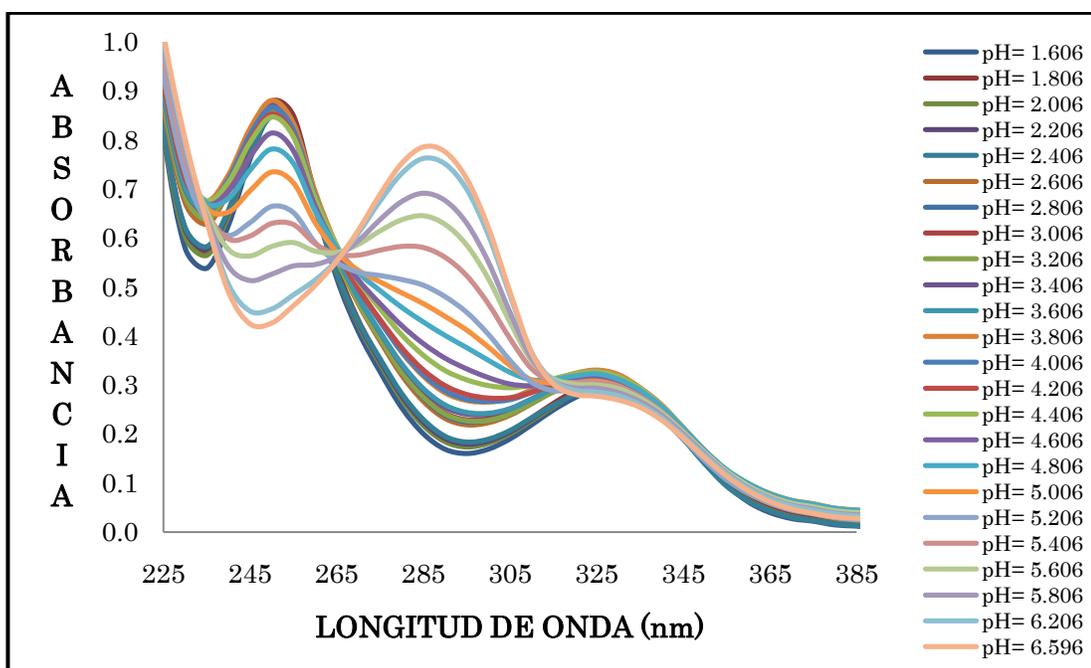
**GRÁFICA No. 5 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH EN MEDIO ACUOSO REACCIÓN ÁCIDO-BASE A UNA  $C_0 = 4.90 \times 10^{-5} M$   $T = 25^\circ C$**



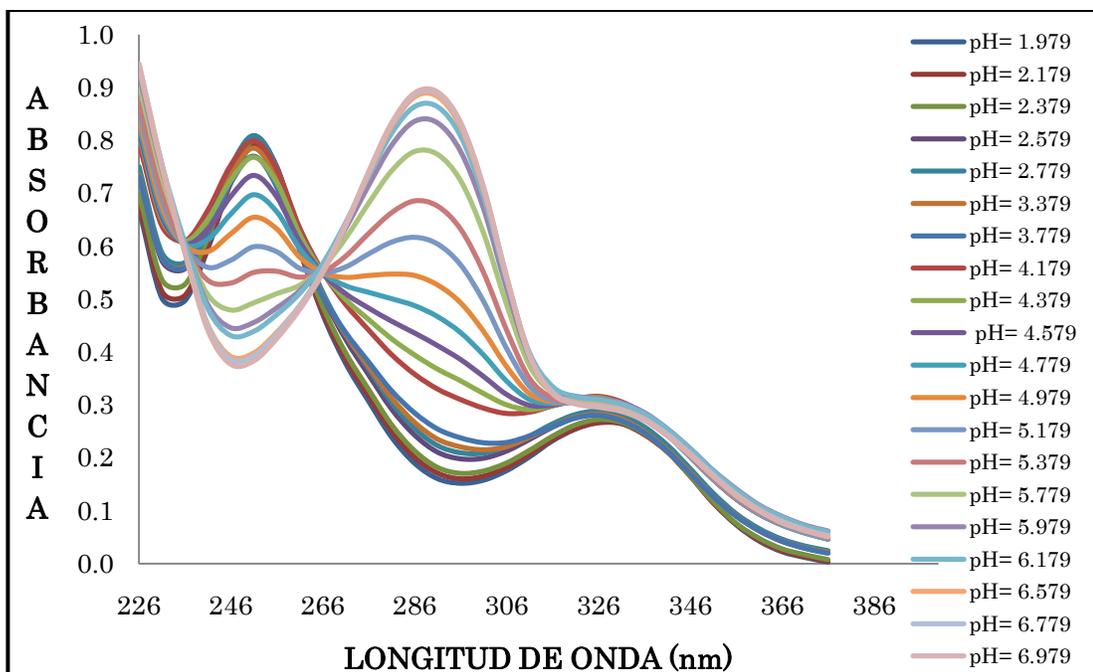
**GRÁFICA No. 6 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH EN MEDIO ACUOSO REACCIÓN BASE-ÁCIDO A UNA  $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$   $T = 25^\circ C$**



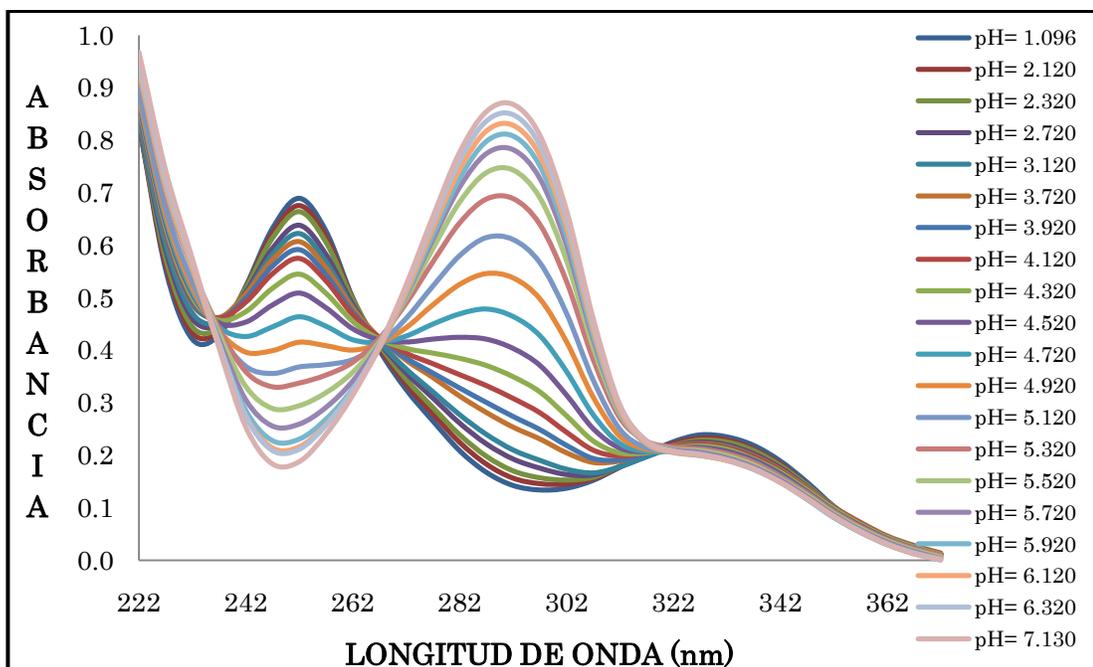
**GRÁFICA No. 7 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 10% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN ÁCIDO-BASE A UNA  $C_0 = 4.90 \times 10^{-5}M$   $T=25^\circ C$**



**GRÁFICA No.8 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 20% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN ÁCIDO-BASE A UNA  $C_0 = 4.90 \times 10^{-5}M$   $T=25^\circ C$**



**GRÁFICA No. 9 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 30% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN ÁCIDO-BASE A UNA  $C_o= 4.90 \times 10^{-5}M$   $T=25^\circ C$**



**GRÁFICA No. 10 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 40% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN ÁCIDO-BASE A UNA  $C_o= 4.90 \times 10^{-5}M$   $T=25^\circ C$**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

Todas las familias de espectros anteriores presentan dos máximos de absorción. La tabla 4 muestra las longitudes de onda de los máximos de cada forma.

**TABLA No. 4 LONGITUDES MÁXIMAS DE ABSORCIÓN DE LAS ESPECIES  $H_2CLX^+$  / $HCLX^\pm$  / $CLX^-$  EN CADA SISTEMA**

% Et OH	$H_2CLX^+$		$HCLX^\pm$		$CLX^-$	
	$\lambda$ MÁX 1	$\lambda$ MÁX 2	$\lambda$ MÁX 1	$\lambda$ MÁX 2	$\lambda$ MÁX 1	$\lambda$ MÁX 2
0	253	328	248	323	283	333
10	251	326	251	326	286	330
20	250	330	250	325	285	330
30	251	331	251	326	286	331
40	252	332	252	322	292	332

Como puede verse en la tabla No. 4 los máximos de absorción para cada especie, ya sea en solución acuosa o mezclas etanol-agua, son prácticamente iguales. Asimismo, Todas estas familias tienen un comportamiento similar. En todas ellas se observa la presencia de más de un punto isobéptico al variar el pH, lo cual indica la existencia de al menos un equilibrio ácido-base.

En la tabla No. 5 se muestra el valor de longitud de onda de cada punto isobéptico en solución acuosa y en mezclas etanol agua.

TABLA No.5 LONGITUDES DE ONDA DE LOS PUNTOS ISOBÉPTICOS

% Et OH	H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> /HCLX <sup>±</sup>		HCLX <sup>±</sup> / CLX <sup>-</sup>		
	$\lambda_{PI 1}$	$\lambda_{PI 2}$	$\lambda_{PI 1}$	$\lambda_{PI 2}$	$\lambda_{PI 3}$
0	263	328	---	263	313
10	241	266	231	266	306
20	240	260	230	265	315
30	241	261	231	266	321
40	237	262	232	267	317

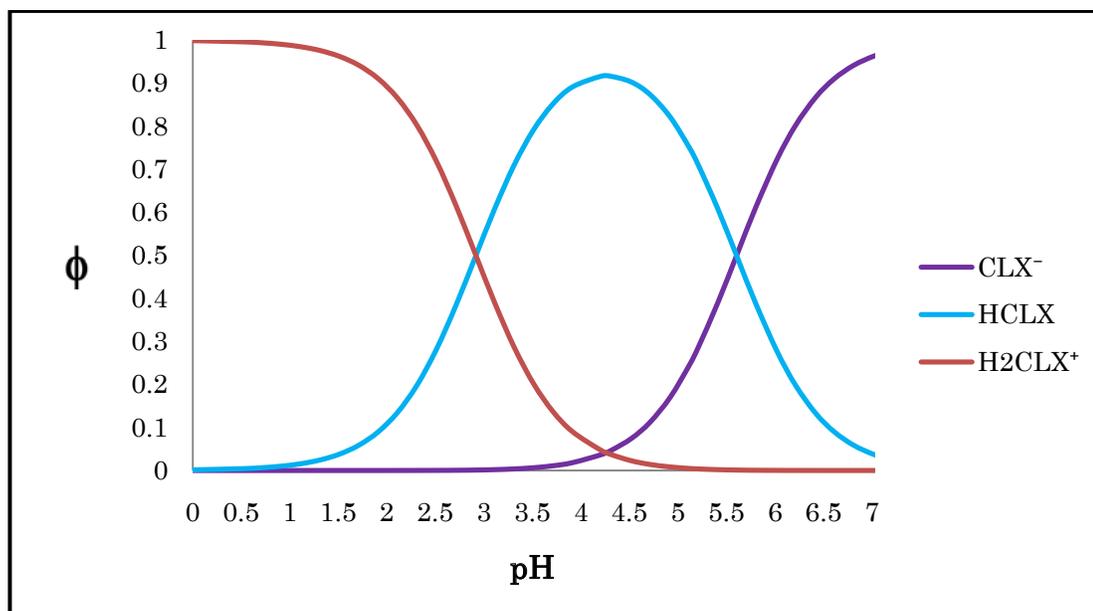
Como puede apreciarse, los valores de  $\lambda$  de los puntos isobépticos, que corresponden a las mezclas etanol-agua casi no varían entre sí, mientras que los valores de  $\lambda$  para el agua muestran una mayor variación.

#### 6.4 RESULTADOS DEL PROGRAMA DE COMPUTACIÓN TRIANG: NÚMERO DE ESPECIES ABSORBENTES

El programa de computación TRIANG determina el número de especies absorbentes para cada sistema a partir de los espectros de absorción para soluciones a diferentes valores de pH y la proposición de un error en las lecturas (en forma de transmitancia  $\Delta T$ ). Debido a que los valores de los coeficientes de absorptividad molar de H<sub>2</sub>CLX<sup>+</sup> y HCLX<sup>±</sup> son muy semejantes, los datos se alimentaron a TRIANG por intervalos de pH's, los cuales se eligieron con base a los diagramas de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

distribución de especies para  $H_2CLX^+$ ,  $HCLX^\pm$ . Este diagrama de distribución de especies para cada sistema (Anexo III).



GRÁFICA No.11 DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES PARA  $H_2CLX^+/HCLX^\pm/CLX^-$  EN MEDIO ACUOSO

A partir del diagrama de distribución de especies se determinó para cada sistema el intervalo de pH de predominio de cada especie.

En la tabla No. 6 se encuentran dichos intervalos.

TABLA No. 6 VALORES DE pH CORRESPONDIENTES AL MÁXIMO DE LA FRACCIÓN DE CADA ESPECIE

% EtOH (v/v)	VALOR DEL pH DE LA ESPECIE $H_2CLX^\pm$	VALOR DEL pH DE LA ESPECIE $HCLX^-$	VALOR DEL pH DE LA ESPECIE $CLX^-$
0	1.310	4.31	7.420
10	2.185	4.18	6.985
20	1.606	4.00	6.596
30	1.979	3.78	6.979
40	1.096	3.50	7.130

TABLA No. 7 INTERVALOS DE pH's CON LOS QUE SE ALIMENTO TRIANG

% EtOH (v/v)	pH's ACIDOS		pH's BÁSICOS	
	INTERVALO DE pH's	NÚMERO DE ESPECTROS	INTERVALO DE pH's	NÚMERO DE ESPECTROS
0	1.310-4.310	7	4.520-7.420	13
10	2.185-4.185	8	4.585-6.985	12
20	1.606-4.006	13	4.206-6.596	11
30	1.979-3.779	7	4.179-6.979	13
40	1.920-3.720	6	3.920-7.130	14

A partir de los valores de pH correspondientes al máximo predominio para cada especie (tabla No.6), se fijaron los intervalos de pH los cuales fueron alimentados al programa TRIANG. De esta forma, la cantidad de espectros y el intervalo de pH's fue variando según cada especie.

El programa de computación TRIANG calculó en total tres especies absorbentes en cada sistema. Como se observa en la tabla No. 8, TRIANG calculó dos especies para cada intervalo de pH. Estas especies corresponden a las formas  $H_2CLX^+$ ,  $HCLX^\pm$  para el primer intervalo, y a las formas  $HCLX^\pm$  y  $CLX^-$  para el segundo intervalo. Este resultado es congruente con los dos equilibrios ácido-base considerados para el cálculo de las constantes y hace evidente que la molécula del *ácido clonixínico* tiene dos valores de pKa, con tres especies absorbentes y no uno como se suponía según las referencias existentes (2).

TABLA No.8 RESULTADOS DE TRIANG

% ETANOL (v/v)	INTERVALO DE ERROR ΔT	H <sub>2</sub> CLX <sup>+</sup> /HCLX <sup>±</sup>	HCLX <sup>±</sup> /CLX <sup>-</sup>	No. TOTAL DE ESPECIES ABSORBENTES
0	0.001-0.010	2	2	3
10	0.003-0.010	2	2	3
20	0.003-0.010	2	2	3
30	0.003-0.010	2	2	3
40	0.003-0.010	2	2	3

### 6.5 RESULTADOS DEL PROGRAMA DE COMPUTACIÓN SQUAD

El *ácido clonixínico* es un ácido diprótico, H<sub>2</sub>CLX<sup>+</sup>. Las etapas de desprotonación sucesivas que presenta este ácido son los siguientes:

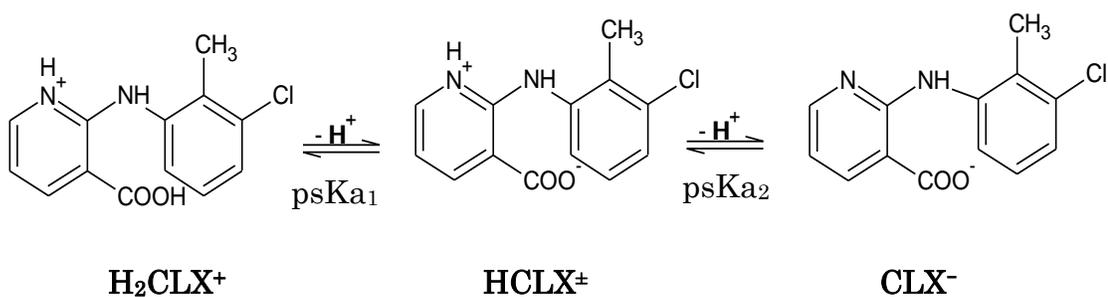


FIGURA No. 9 ETAPAS DE DESPROTONACIÓN DEL ÁCIDO CLONIXÍNICO

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del análisis de los grupos funcionales, se propone que el del grupo carboxílico done el primer protón asociado al  $pK_{a1}$ , por ser el más ácido. El segundo protón sería por la amina secundaria correspondiente a  $pK_{a2}$ .

Las formas ácido-base presentan las cargas mostradas en la escala de pH.



Para determinar los valores de  $psKa$  del *ácido clonixínico* en agua y en cada mezcla de etanol-agua, se usó el programa SQUAD a partir de los datos experimentales de absorbancia a diferentes pH's, la concentración total del sistema, los valores de  $\beta$  propuestos y los equilibrios químicos de disociación del *ácido clonixínico/clonixinato*.

En la tabla No. 9 se describen los intervalos de pH's empleados así como la cantidad de espectros que se emplearon para alimentar el programa SQUAD.

**TABLA No. 9 DATOS EMPLEADOS PARA TRABAJAR CON SQUAD**

% ETANOL (v/v)	INTERVALO DE pH's	NÚMERO DE ESPECTROS
0	1.310-7.420	20
10	2.185-6.985	20
20	1.606-6.595	24
30	1.979-6.979	20
40	1.920-7.130	20

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la tabla 10 se muestran los valores de psKa obtenidos:

**TABLA 10. RESULTADOS DE SQUAD PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE psKa PARA EL ÁCIDO CLONIXÍNICO/CLONIXINATO EN DIVERSAS MEZCLAS ETANOL AGUA**

% EtOH (v/v)	psKa <sub>1</sub>	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	psKa <sub>2</sub>	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	U*
0	2.92	0.025	5.60	0.007	1.9447x10 <sup>-2</sup>
10	2.80	0.164	5.44	0.009	3.2575x10 <sup>-2</sup>
20	2.64	0.044	5.34	0.012	1.1009x10 <sup>-1</sup>
30	2.53	0.064	5.12	0.010	5.9775x10 <sup>-2</sup>
40	2.29	0.051	4.95	0.004	8.7681x10 <sup>-3</sup>

U\* es la suma de cuadrados de la diferencia entre la absorbancia calculada y experimental

Como puede observarse en la tabla 10, los valores de psKa<sub>1</sub> y psKa<sub>2</sub> disminuyen a medida que el porcentaje de etanol aumenta. En el caso del psKa<sub>1</sub>, este efecto se atribuye a que la solvatación del ión dipolar HCLX<sup>±</sup> es más favorecida que la del, H<sub>2</sub>CLX<sup>+</sup>; a medida que el contenido de etanol aumenta en la mezcla, el equilibrio de disociación se desplaza más hacia la derecha y los valores de psKa<sub>1</sub> disminuyen.

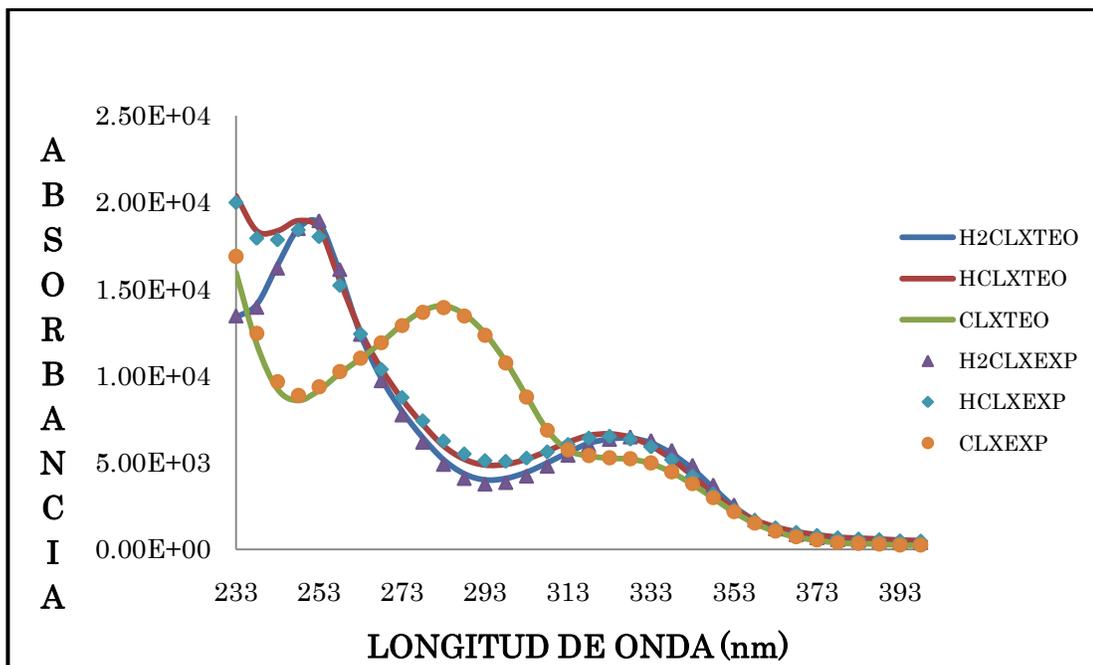
En el caso de  $pK_{a2}$ , cuando la proporción del etanol aumenta, la solvatación del anión  $CLX^-$  es más importante con respecto del ión dipolar  $HCLX^\pm$  y el equilibrio ácido base se desplaza hacia derecha y en consecuencia los valores de  $pK_{a2}$  disminuyen. Este comportamiento depende esencialmente de la carga de las especies y su interacción específica con las moléculas del disolvente en cuestión. Existen estudios de determinación de  $pK_a$ 's en sistemas similares como los aminoácidos donde este tipo de tendencias son similares (37).

En cuanto a los valores de desviación estándar para el  $pK_{a1}$  son mayores que los para los del  $pK_{a2}$  esto es debido a la complejidad del primer equilibrio de disociación. Asimismo, los valores de  $U$  se consideran aceptables.

El hecho de constatar que el *clonixinato de lisina* posee dos  $pK_a$ s y la atribución de sus sitios funcionales, pertenecientes sólo al ácido *clonixínico*, constituye una aportación fundamental para comprender la acción de este fármaco dentro de la célula.

6.5.1 SIMULACIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN A PARTIR DE LOS COEFICIENTES DE ABSORTIVIDAD MOLAR OBTENIDOS POR SQUAD

El programa SQUAD además de refinar las constantes, realiza una simulación de los coeficientes de absorptividad molar, a partir de los cuales se simulan los espectros y se comparan con los experimentales, para comprobar la bondad del cálculo de dichas constantes. En la Grafica No. 9 se presentan los espectros tanto teóricos como experimentales y se observa la similitud que existe entre ambos espectros esto implica que el modelo teórico propuesto se ajusta de manera adecuada a los datos experimentales obtenidos Este mismo comportamiento se observa en todos los sistemas (Anexo IV).



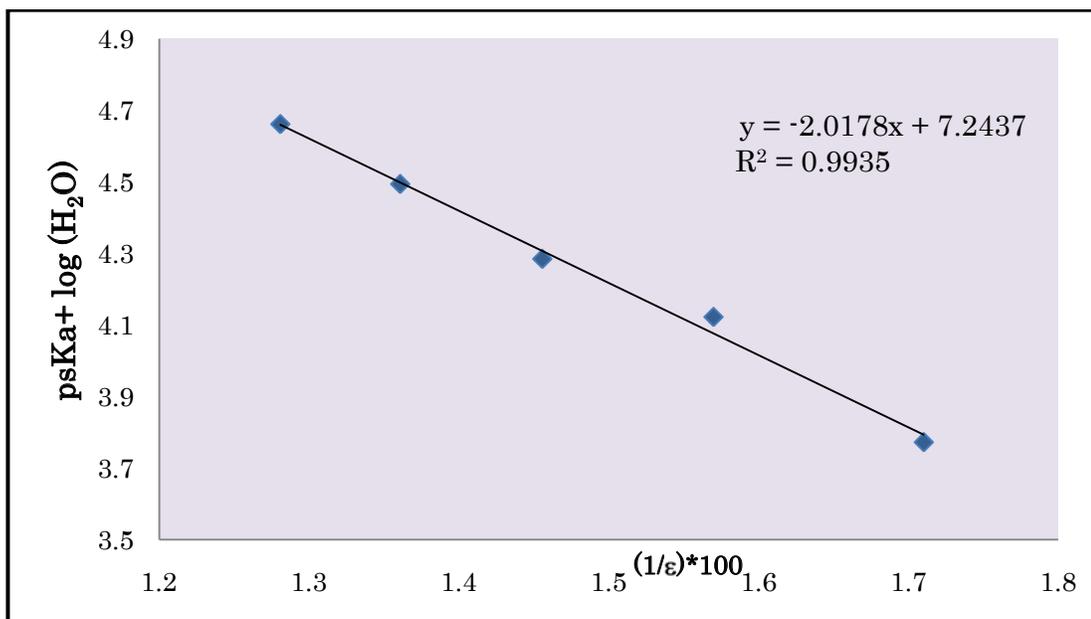
GRÁFICA No. 12 ESPECTROS DE ABSORCIÓN SIMULADOS vs EXPERIMENTALES

## 6.6 PREDICCIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ

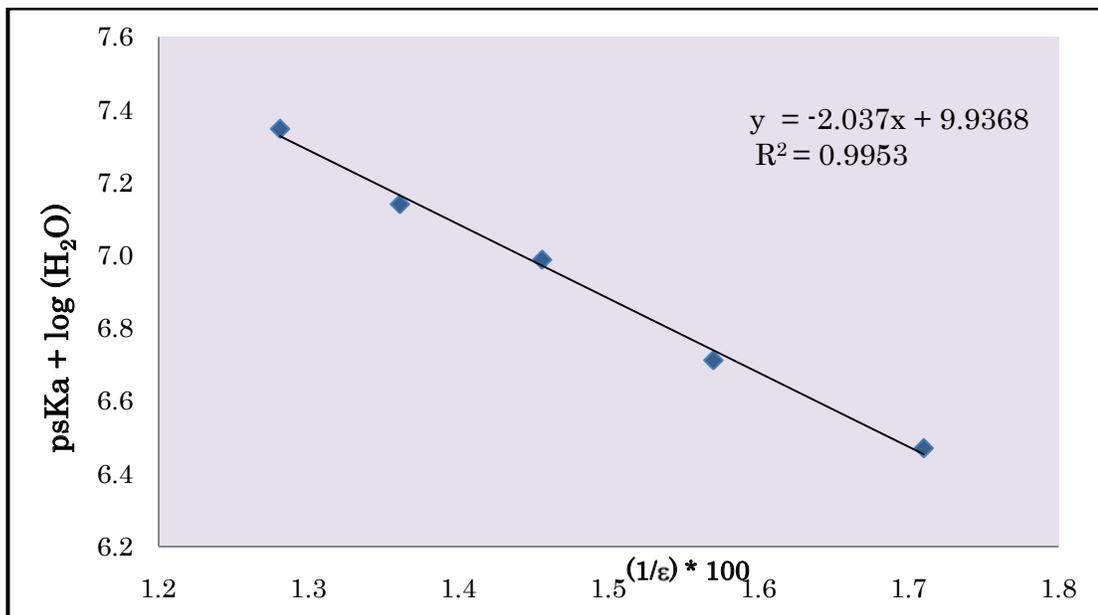
A continuación se presentan dos opciones de cálculo que permiten predecir el valor de las constantes de acidez para mezclas etanol agua de cualquier composición.

1) Yashuda (7) y Shedlovisky (8) derivaron una función que relaciona las constantes de acidez con la constante dieléctrica del medio:  $\text{psKa} + \log (\text{H}_2\text{O}) = B + A(1/\epsilon)100$ , donde  $(\text{H}_2\text{O})$  denota la concentración del agua y  $\epsilon$  es el valor de la constante dieléctrica de la mezcla (los valores calculados de  $\epsilon$  de las mezclas se pueden consultar en el anexo V). Los términos A y B representan la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente.

Las graficas No.13 y 14 muestran las gráficas de  $\text{psKa} + \log (\text{H}_2\text{O})$  vs  $(1/\epsilon)*100$  con un comportamiento lineal en el intervalo de 0 a 40 % de etanol, con pendiente negativa.



GRÁFICA No.13. MÉTODO YASHUDA-SHEDLOVISKY PARA EL ÁCIDO CLONIXÍNICO



**GRAFICA No. 14. MÉTODO DE YASHUDA-SHELOVISKY PARA EL CLONIXINATO ÁCIDO**

Considerando los resultados experimentales obtenidos por SQUAD, se establecieron las funciones respectivas y se calcularon los valores de psKa para otras mezclas de composición intermedia, no determinadas experimentalmente en este estudio (Tabla 13).

### 6.6.1. REGRESIÓN MULTIPARAMÉTRICA A PARTIR DE PARÁMETROS EMPÍRICOS DE POLARIDAD.

Se realizaron regresiones multiparamétricas que involucran parámetros empíricos de polaridad, para establecer modelos para la predicción de las constantes de acidez del *ácido clonixínico*. Las mejores regresiones se obtuvieron considerando dos parámetros:

1. El término  $E_T(30)$  o  $E_T^N$ : es una medida combinada de dipolaridad/polarizabilidad\* y de la acidez o capacidad donadora del puente de hidrógeno del disolvente o acidez de Lewis.
2. El término Kirkwood-Onsager (38,39),  $\frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1}$ , considera la energía de un dipolo puesto en un medio de constante dieléctrica  $\epsilon$

La ecuación obtenida es del tipo:

$$psKa = a + b \left( \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) * 100 + c E_T^N$$

---

\*El término polarizabilidad se refiere a la capacidad de la nube electrónica de un ion o molécula a deformarse bajo la influencia de cargas cercanas o dipolos cercanos. La deformación de la nube electrónica crea un dipolo en el ion o molécula.

El término **a** es la cantidad estadística que corresponde al valor del pKa en fase gaseosa o en un disolvente inerte. Los valores de **b** y **c** son los coeficientes de regresión que describen la sensibilidad de cada propiedad a los diferentes mecanismos de interacción soluto/disolvente.

TABLA No. 11 ECUACIONES OBTENIDAS

ECUACIONES	R <sup>2</sup>	σ
$psKa_1 = -99.6778 - 0.0676792 \left( \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) * 100 + 2.09339E_T^N$	98.822	0.03939
$psKa_2 = -101.653 + 2.18982 \left( \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right) * 100 - 0.14627E_T^N$	99.425	0.0278

Ya que el coeficiente **b** es mayor que **c**, se puede concluir que las interacciones soluto-disolvente descritas por la constante dieléctrica, tienen mayor peso sobre el valor de psKa que las del E<sub>T</sub><sup>N</sup>.

Al sustituir los valores de cada término correspondiente a  $\left( \frac{\epsilon_M - 1}{2\epsilon_M + 1} \right)$  y E<sub>T</sub><sup>N</sup> cada mezcla, se pueden predecir los valores de psKa en mezclas de diferente composición.

La Tabla 12 resume los valores predichos por las correlaciones multiparamétricas por Yashuda-Shedlovisky y los parámetros empíricos de polaridad.

**TABLA 12. VALORES DE  $pK_a$  PREDICHOS POR LAS CORRELACIONES MULTIPARAMÉTRICAS POR YASHUDA-SHEDLOVISKY Y LOS PARÁMETROS EMPÍRICOS DE POLARIDAD**

% Etanol (v/v)	$pK_{a1}$		$pK_{a2}$	
	YASHUDA-SHEDLOVISKY	PARÁMETROS DE POLARIDAD	YASHUDA-SHEDLOVISKY	PARÁMETROS DE POLARIDAD
5	2.86	2.84	5.53	5.48
15	2.73	2.72	5.40	5.38
25	2.58	2.57	5.24	5.23
35	2.39	2.38	5.05	5.04
45	2.14	2.15	4.80	4.80

En esta tabla se muestra que los valores predichos de las constantes, no muestran diferencia significativa entre el método pero, si existe diferencias entre el porcentaje de etanol. Esta aseveración se confirmará a continuación con la prueba de ANOVA multifactorial.

### 6.6.2 CÁLCULO DE ANOVA MULTIFACTORIAL

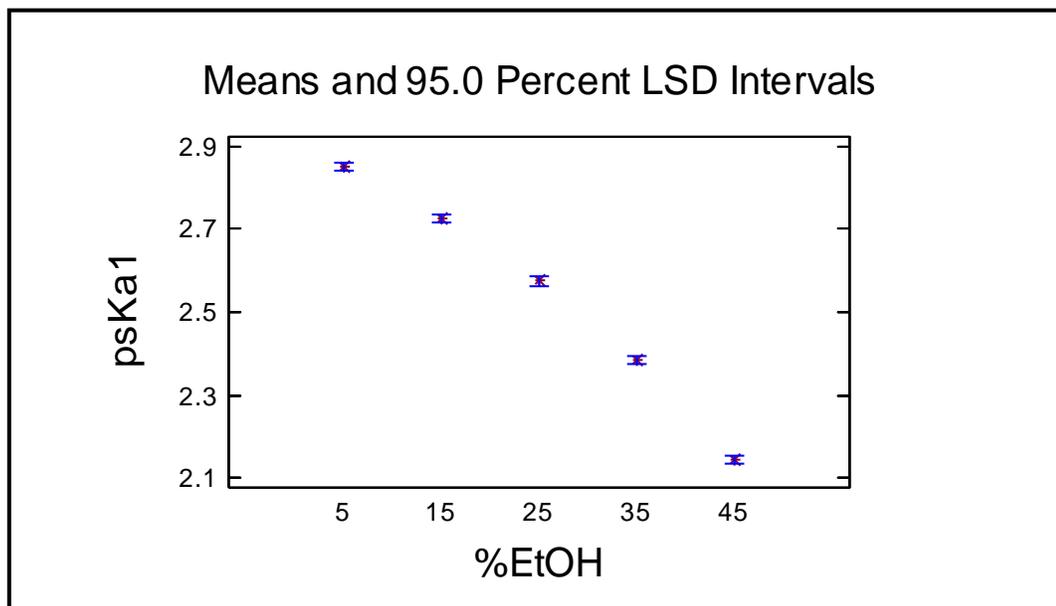
El análisis de varianza (Tablas No. 13 y 14) nos muestra que la variación en el porcentaje de etanol en las mezclas, ocasiona cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en los valores de psKa, tal como era de esperarse (ver gráfica No.15 y 17). Por el contrario, los valores de psKa<sub>1</sub> y psKa<sub>2</sub> predichos por el método Yashuda-Shedlovisky y con los parámetros de polaridad, no presentan cambios significativos ( $P > 0.05$ ) (ver gráfica No. 16 y 18).

**TABLA No. 13 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL psKa<sub>1</sub>**

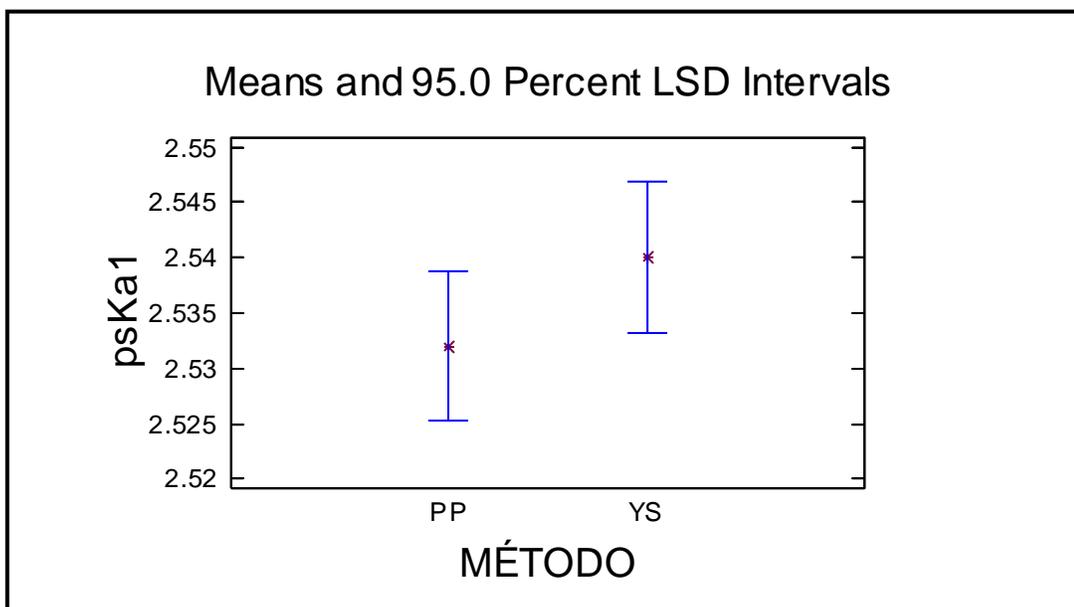
Analysis of Variance for psKa1 - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:%EtOH	0.62304	4	0.15576	2596.00	<b>0.0000</b>
B:MÉTODO	0.00016	1	0.00016	2.67	<b>0.1778</b>
RESIDUAL	0.00024	4	0.00006		
TOTAL (CORRECTED)	0.62344	9			

All F-ratios are based on the residual mean square error.



GRÁFICA No.15 MEDIAS DEL  $psKa_1$  AL 95% LSD PARA EL PORCENTAJE DE ETANOL



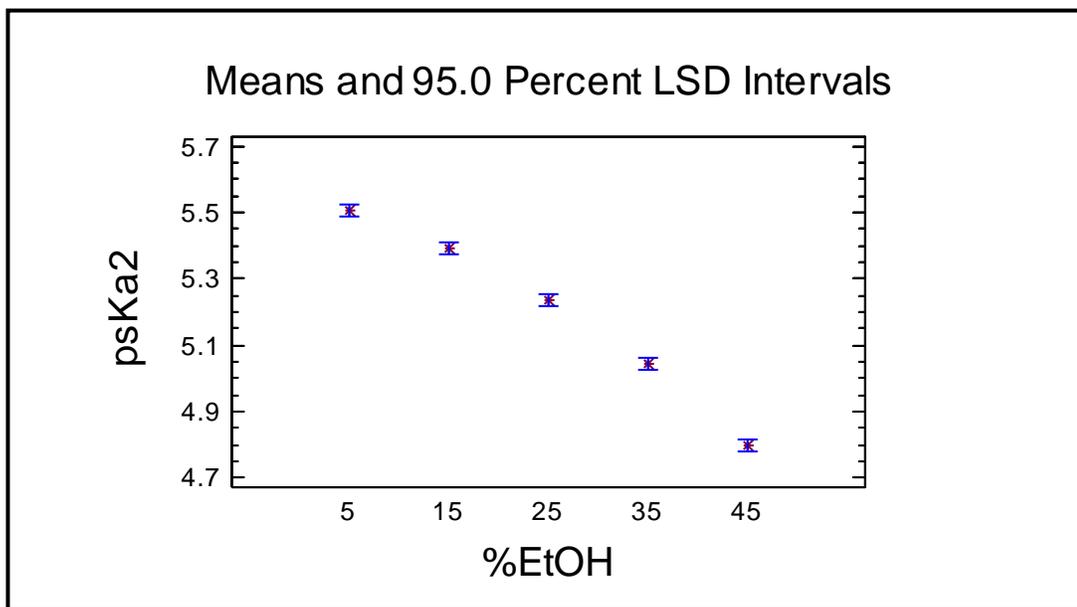
GRÁFICA No.16 MEDIAS DEL  $psKa_1$  AL 95% LSD PARA EL MÉTODO DE YASHUDA-SHEDLOVSKY (YS) Y LOS PARÁMETROS EMPÍRICOS DE POLARIDAD (PP)

**TABLA No. 14 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EL psKa<sub>2</sub>**

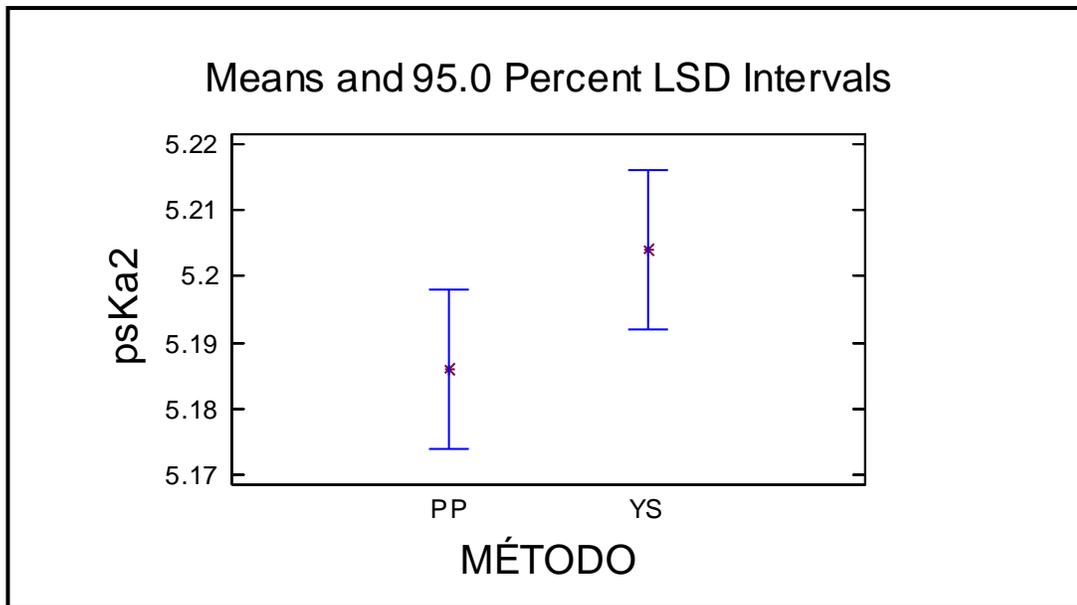
Analysis of Variance for psKa<sub>2</sub> - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
-----					
MAIN EFFECTS					
A:%EtOH	0.6285	4	0.157125	849.32	<b>0.0000</b>
B:MÉTODO	0.00081	1	0.00081	4.38	<b>0.1045</b>
RESIDUAL	0.00074	4	0.000185		
-----					
TOTAL (CORRECTED)	0.63005	9			
-----					

All F-ratios are based on the residual mean square error.



**GRÁFICA No.17 MEDIAS DEL psKa<sub>2</sub> AL 95% LSD PARA EL PORCENTAJE DE ETANOL**



**GRÁFICA No.18 MEDIAS DEL psKa<sub>2</sub> AL 95% LSD PARA EL MÉTODO DE YASHUDA-SHEDLOVISKY (YS) Y LOS PARÁMETROS EMPÍRICOS DE POLARIDAD (PP)**

## 7. CONCLUSIONES

- Las evidencias experimentales demuestran la presencia de dos equilibrios ácido-base para el *ácido clonixíco* en el *clonixinato de lisina*.
- El número de especies absorbentes y las constantes de acidez (pKa) se determinaron espectrofotométricamente en agua y mezclas etanol-agua a través de los programas TRIANG y SQUAD, respectivamente.
- Los dos valores de constantes de acidez obtenidas disminuyeron al ir aumentando la polaridad del sistema. Este comportamiento depende esencialmente de la carga de las especies y su interacción específica con las moléculas del disolvente.
- Se propusieron los equilibrios de acidez y se asociaron a cada equilibrio su constante de acidez.

## CONCLUSIONES

---

---

- A partir de los psKa calculados, aplicando la función Yasuda-Shedlovisky y usando dos parámetros de polaridad dos aproximaciones multiparamétricas la predicción de los psKa en mezclas de diferente composición, fue posible. Se observó que el término de la constante dieléctrica tiene mayor influencia sobre los psKa que el término  $E_T^N$
- El conocimiento de las constantes de acidez del *ácido clonixínico* en mezclas etanol-agua permitirá vislumbrar un mecanismo del paso del fármaco a través de la membrana lipofílica de la célula.

## 8. ANEXOS

### ANEXO I. OBTENCIÓN DE LOS VALORES DE $\delta$

Los valores de  $\delta$  están reportados en el libro de Popovich (21) para la mezclas etanol agua en porcentajes en peso. Debido a que en el desarrollo del presente trabajo se emplearon porcentajes diferentes, fue necesaria su obtención por medio de un procedimiento de interpolación

Para cumplir con lo anterior, los valores  $\delta$  originales fueron empleados para poder obtener ecuaciones que permitirán la interpolación a los porcentajes correspondientes. A continuación en la tabla A.1 se presentan las ecuaciones obtenidas, así como el intervalo en el cual puede ser aplicada y el valor de coeficiente de correlación  $R^2$

TABLA A.1 ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE  $\delta$ 

INTERVALO % PESO DE ETANOL	ECUACIÓN	R <sup>2</sup>
20-80	$\delta = 0.11091 - 0.01359(\% \text{ p/p}) + 5.44974 \times 10^{-4} (\% \text{ p/p})^2 - 4.69136 \times 10^{-6} (\% \text{ p/p})^3$	0.99959
70-100	$\delta = -72.55409 + 4.3856 (\% \text{ p/p}) - 0.09794 (\% \text{ p/p})^2 + 9.62823 \times 10^{-4} (\% \text{ p/p})^3 - 3.52369 \times 10^{-6} (\% \text{ p/p})^4$	0.99954

Estas ecuaciones permite el cálculo de los valores de  $\delta$  necesarios para la corrección de los valores de pH operacional.

La tabla A.1 muestra los valores reportados para las constantes de  $\delta$

TABLA A.2 VALORES DE  $\delta$  EN MEZCLAS AGUA ETANOL

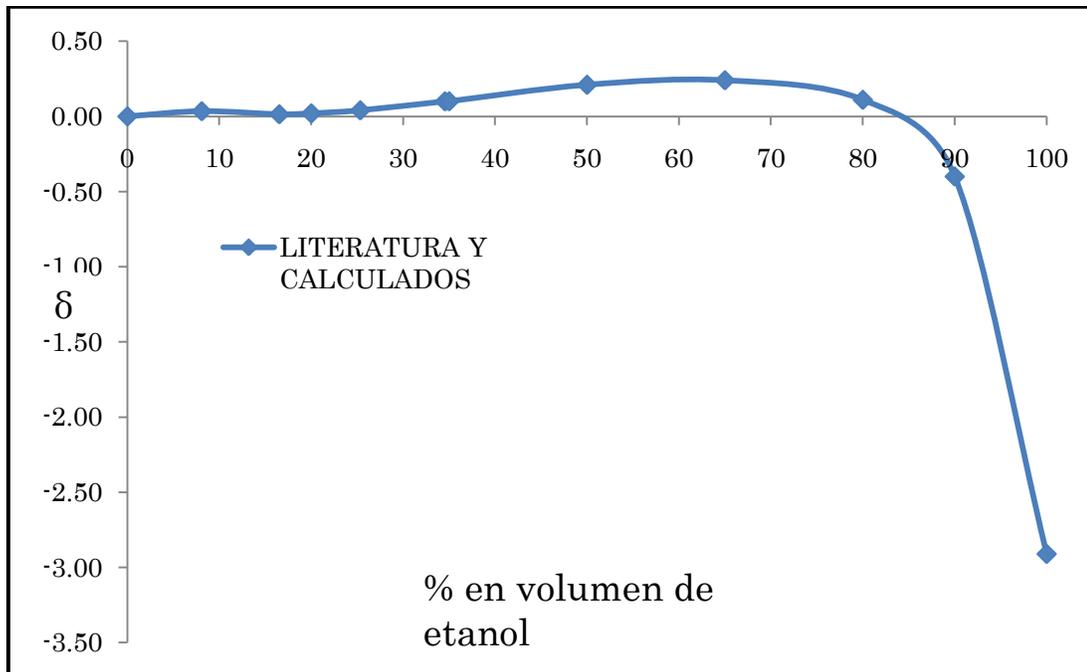
% EN PESO DE ETANOL	VALOR DE $\delta$
0	0.0000
20	0.0200
35	0.1000
50	0.2100
65	0.2400
80	0.1100
90	-0.400
100	-2.910

En la tabla A.3 se muestra los valores de  $\delta$  empleados en los porcentajes de mezcla adecuados.

**TABLA A.3 VALORES DE  $\delta$  PARA LA PARTE EXPERIMENTAL**

<b>% EN PESO DE ETANOL</b>	<b>VALO DE <math>\delta</math></b>
8.08	0.0342
16.52	0.0139
25.33	0.0400
34.54	0.0997

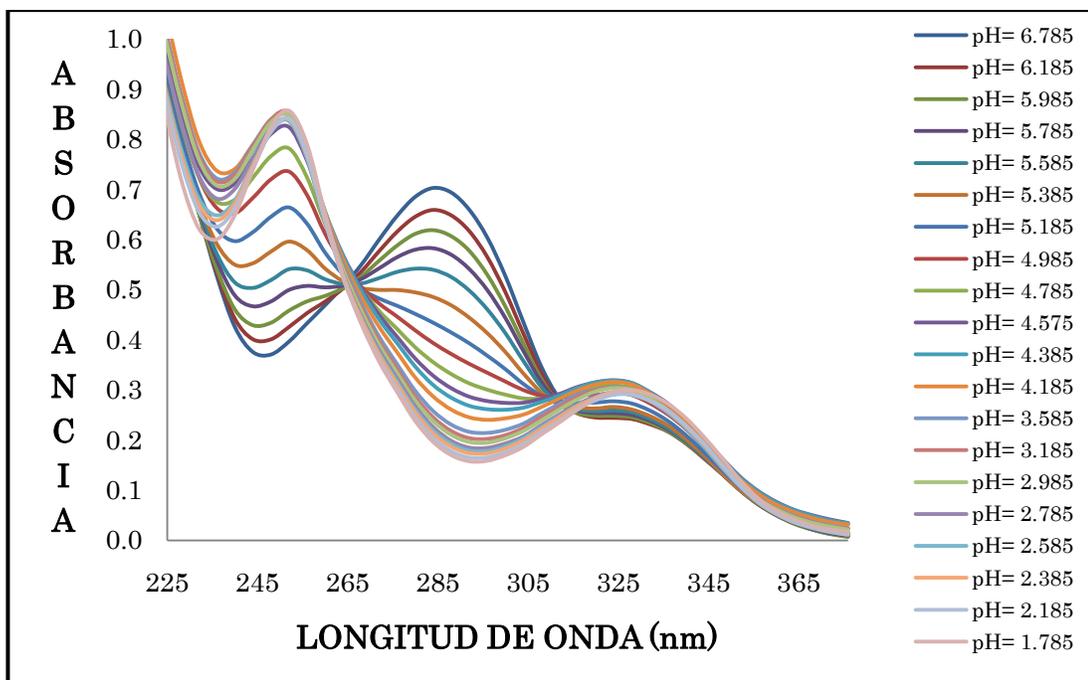
Los valores de  $\delta$  calculados para nuestros sistemas se gráfica junto con los valores originales para observar el comportamiento de nuestros valores calculados con las ecuaciones anteriores (Figura A.1)



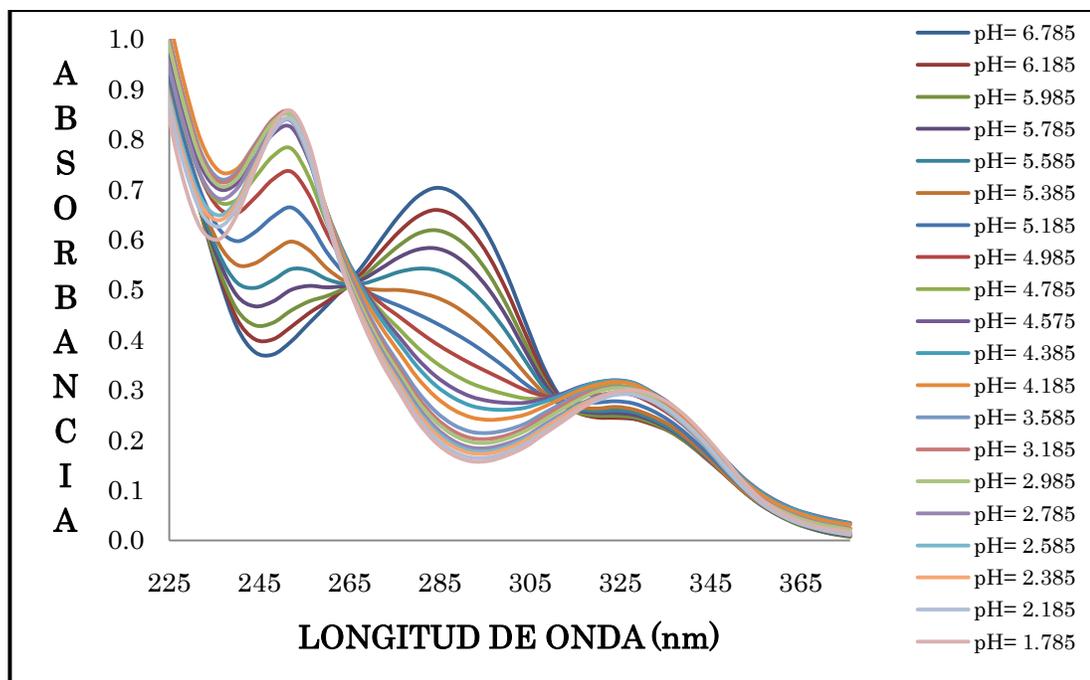
**GRÁFICA A.1 COMPORTAMIENTO DE LOS VALORES DE  $\delta$**

Como se observa en la figura A.1 los valores de  $\delta$  calculados para los sistemas de trabajo no presentan desviaciones considerables de la tendencia original por lo que las ecuaciones anteriores pueden ser empleadas en la obtención de los valores que se encuentran dentro del intervalo de aplicaciones de las mismas.

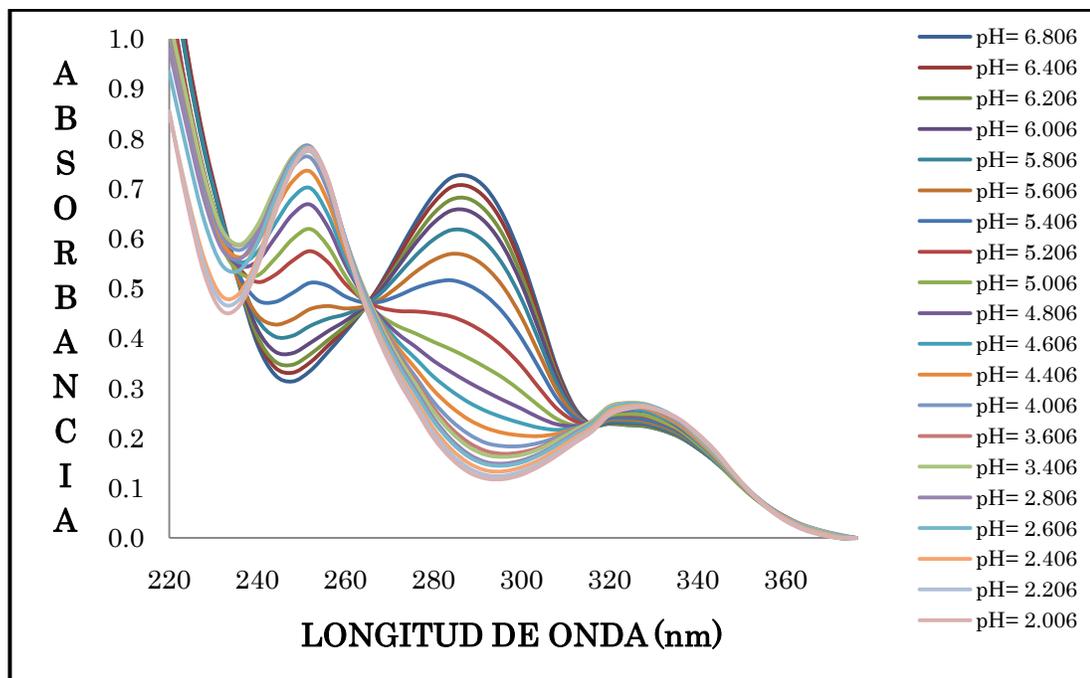
## ANEXO II

ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL CLONIXINATO DE  
LISINA  
REACCIÓN BASE-ÁCIDO

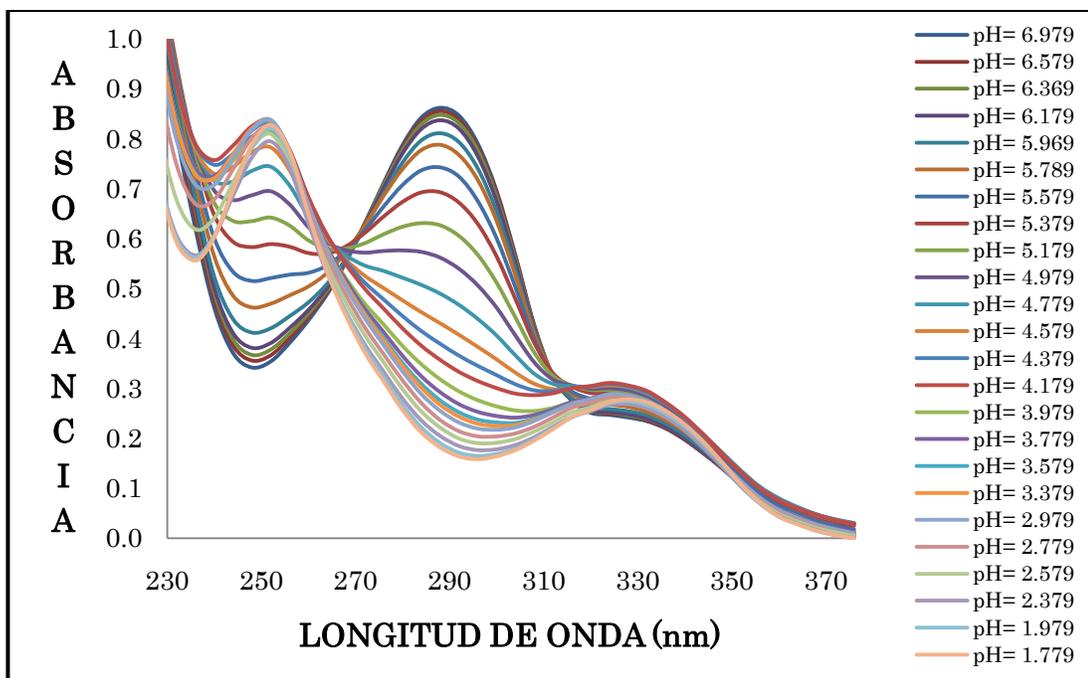
GRÁFICA No. A2 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN  
FUNCIÓN DEL pH EN MEDIO ACUOSO REACCIÓN BASE-ÁCIDO  
A UNA  $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$   $T = 25^\circ C$



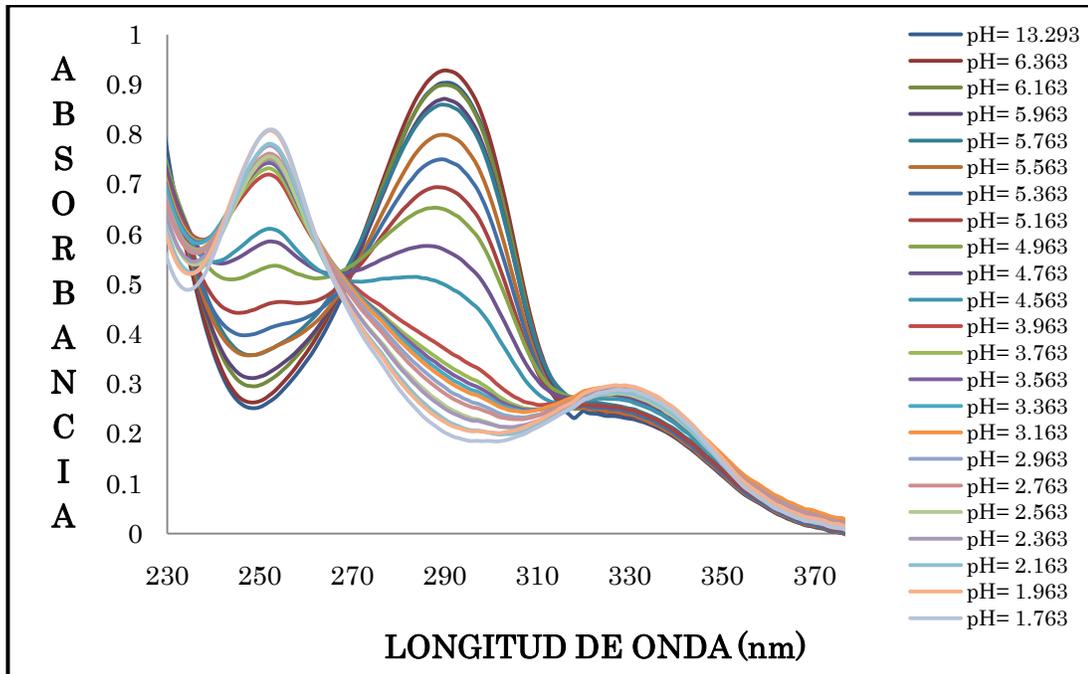
GRÁFICA No. A3 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 10% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN BASE- ÁCIDO  $C_0 = 4.91 \times 10^{-5}M$   $T=25^\circ C$



GRÁFICA No. A4 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 20% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN BASE- ÁCIDO  $C_0 = 4.91 \times 10^{-5}M$   $T=25^\circ C$



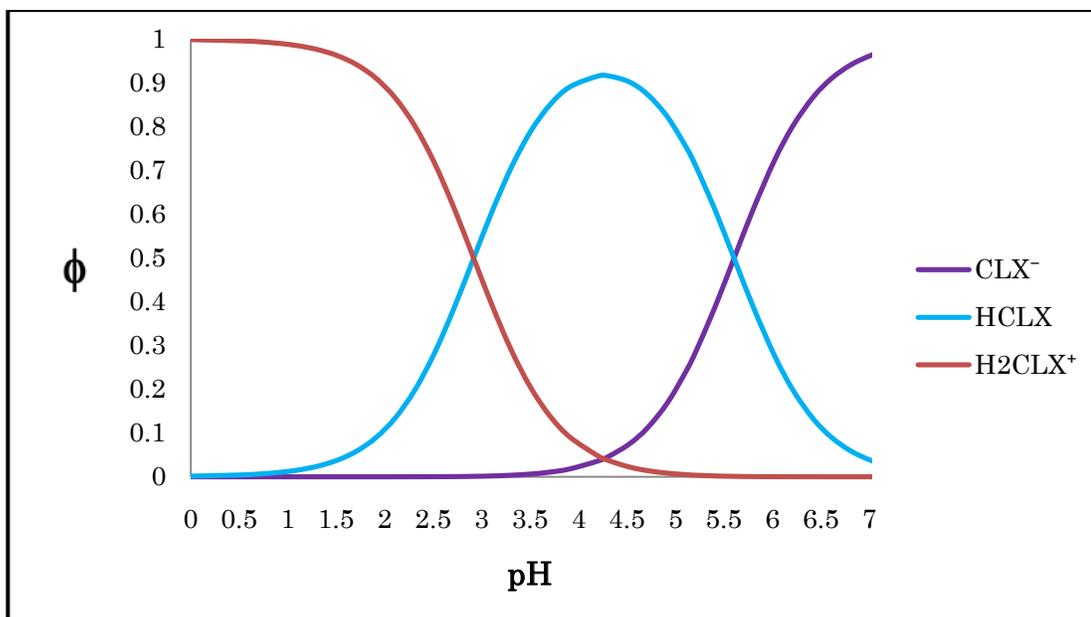
**GRÁFICA No. A5 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 30% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN BASE- ÁCIDO  $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$   $T = 25^\circ C$**



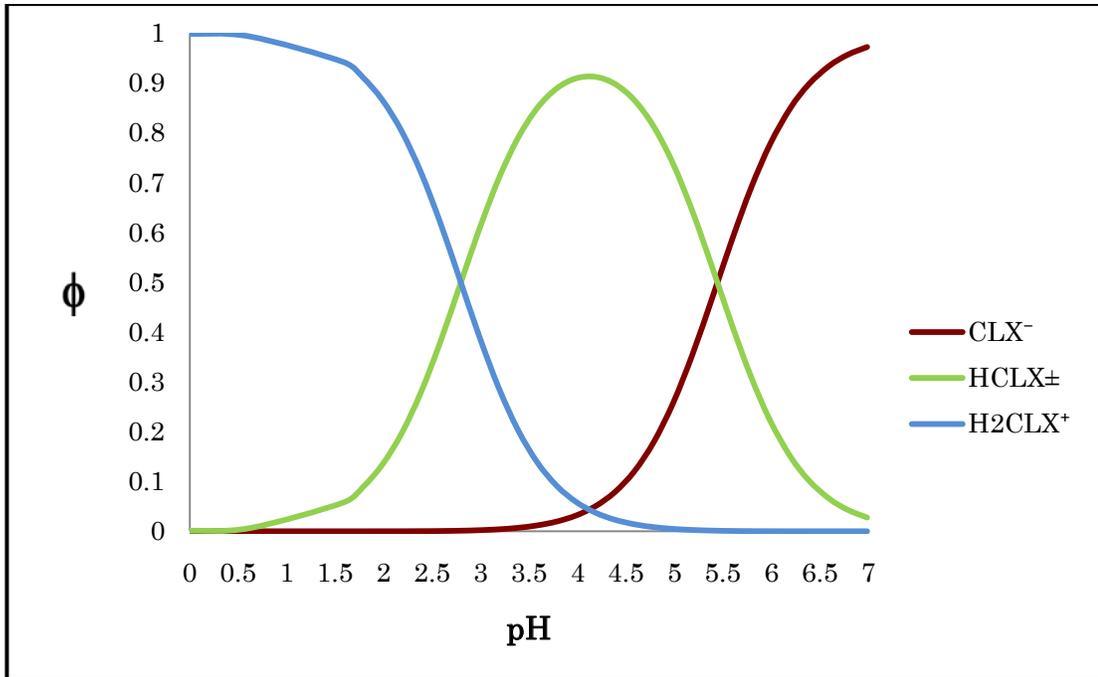
**GRÁFICA No. A6 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DEL  $H_2CLX^+$  EN FUNCIÓN DEL pH PARA UN SISTEMA AL 40% EN VOLUMEN DE ETANOL REACCIÓN BASE- ÁCIDO  $C_0 = 4.91 \times 10^{-5} M$   $T = 25^\circ C$**

## ANEXO III

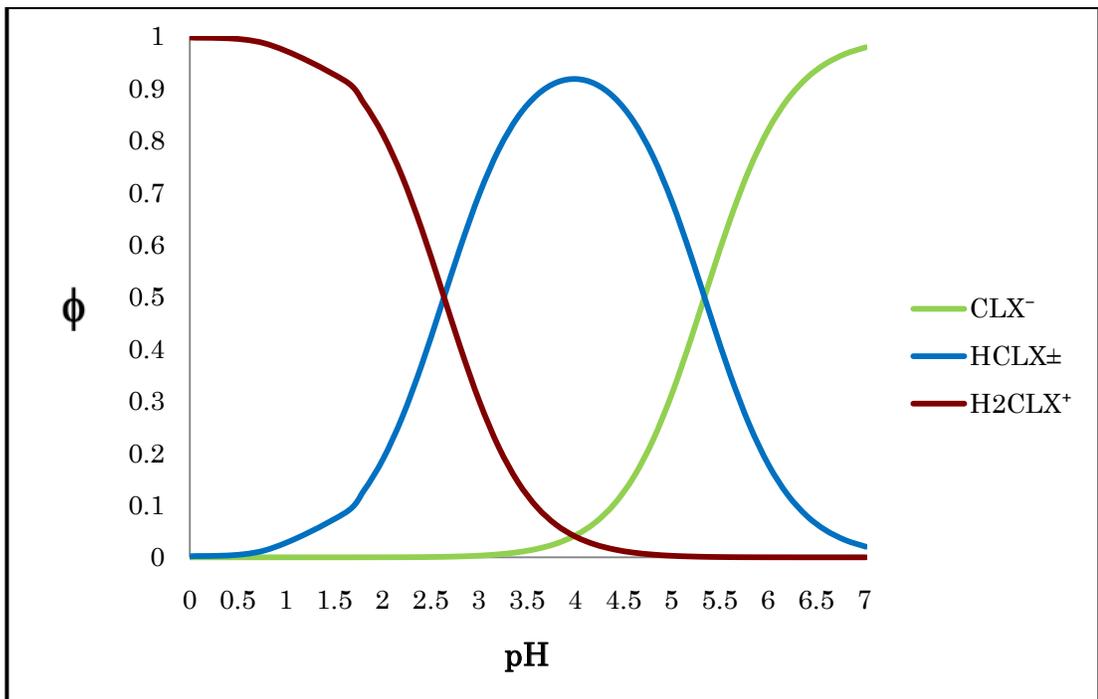
Diagramas de distribución de especies para todos los sistemas (medio acuoso y 10,20,30,40 % de etanol) en la reacción ácido base.



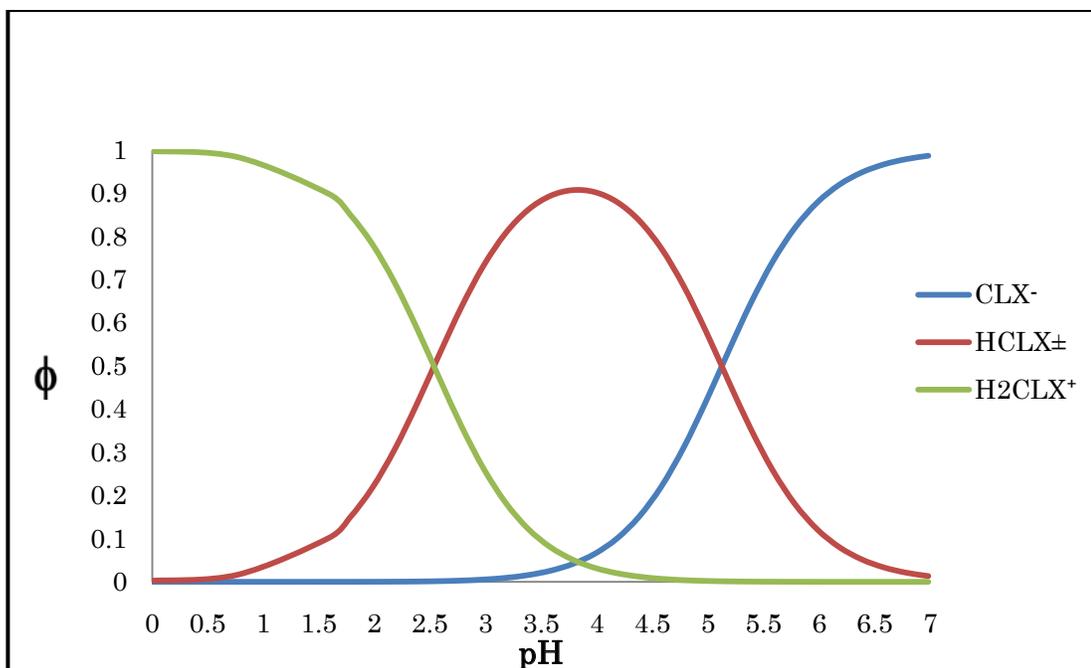
GRÁFICA No. A.7 DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES PARA  $H_2CLX^+/HCLX^\pm/CLX^-$  EN MEDIO ACUOSO



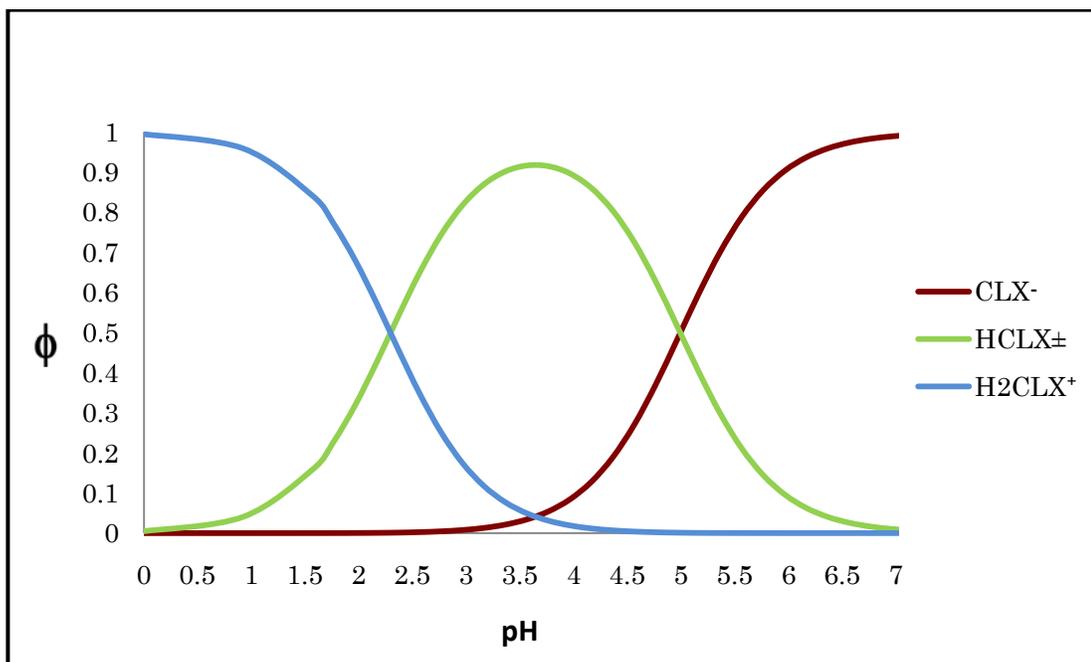
GRÁFICA No. A.8 DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES PARA  $H_2CLX^+/HCLX^\pm/CLX^-$  EN UN SISTEMA AL 10% DE ETANOL



GRÁFICA No. A.9 DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES PARA  $H_2CLX^+/HCLX^\pm/CLX^-$  EN UN SISTEMA AL 20% DE ETANOL



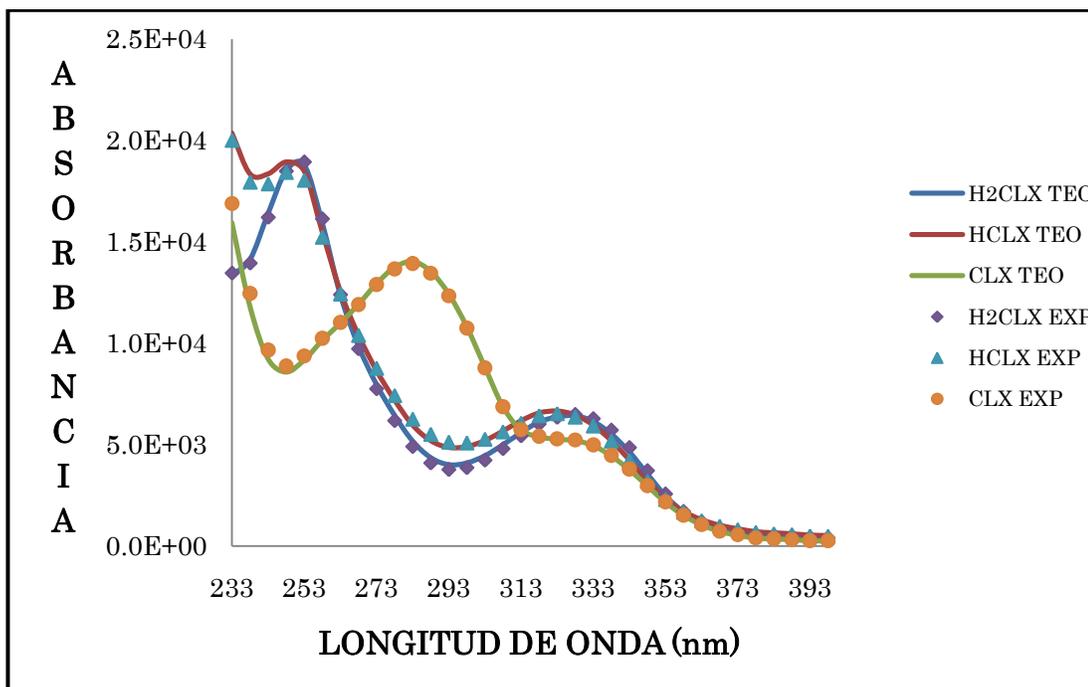
GRÁFICA No. A.10 DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES PARA  $\text{H}_2\text{CLX}^+/\text{HCLX}^\pm/\text{CLX}^-$  EN UN SISTEMA AL 30% DE ETANOL



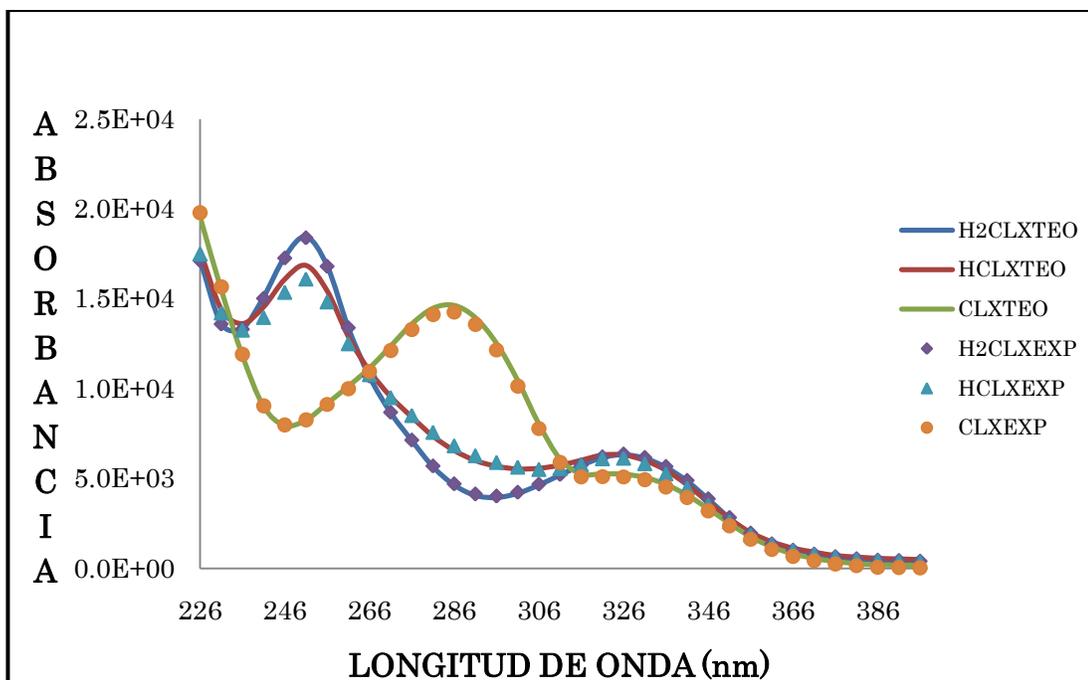
GRÁFICA No. A.11 DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES PARA  $\text{H}_2\text{CLX}^+/\text{HCLX}^\pm/\text{CLX}^-$  EN UN SISTEMA AL 40% DE ETANOL

## ANEXO IV

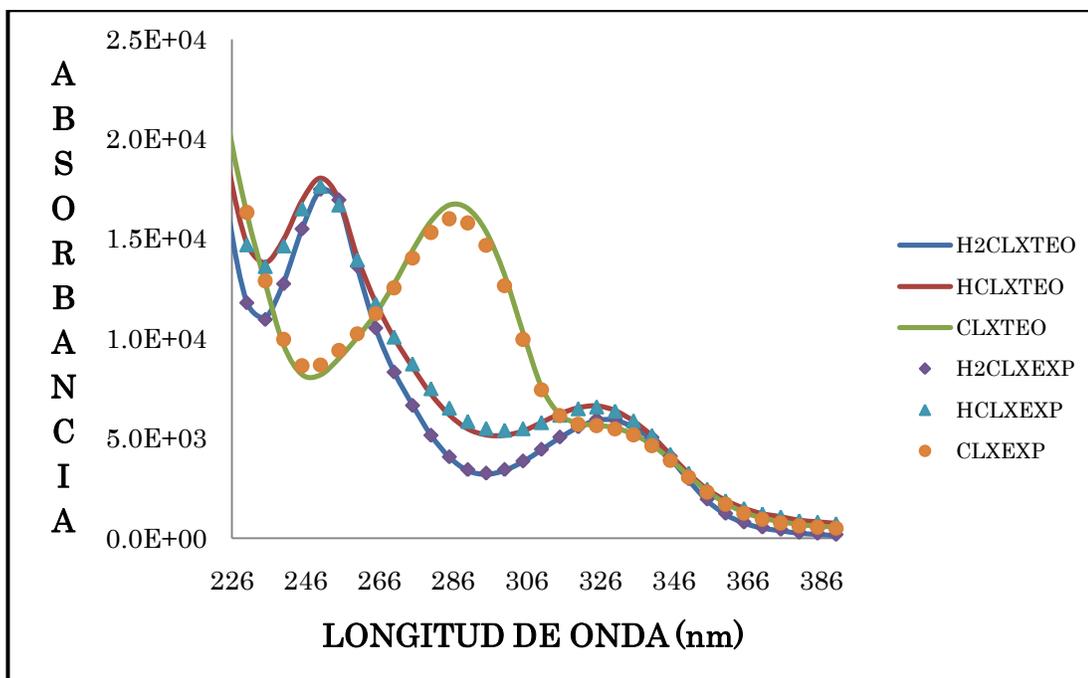
Espectros de absorción simulados comparados con los experimentales para todos los sistemas (medio acuoso y 10,20,30,40 % de etanol) en la reacción ácido base.



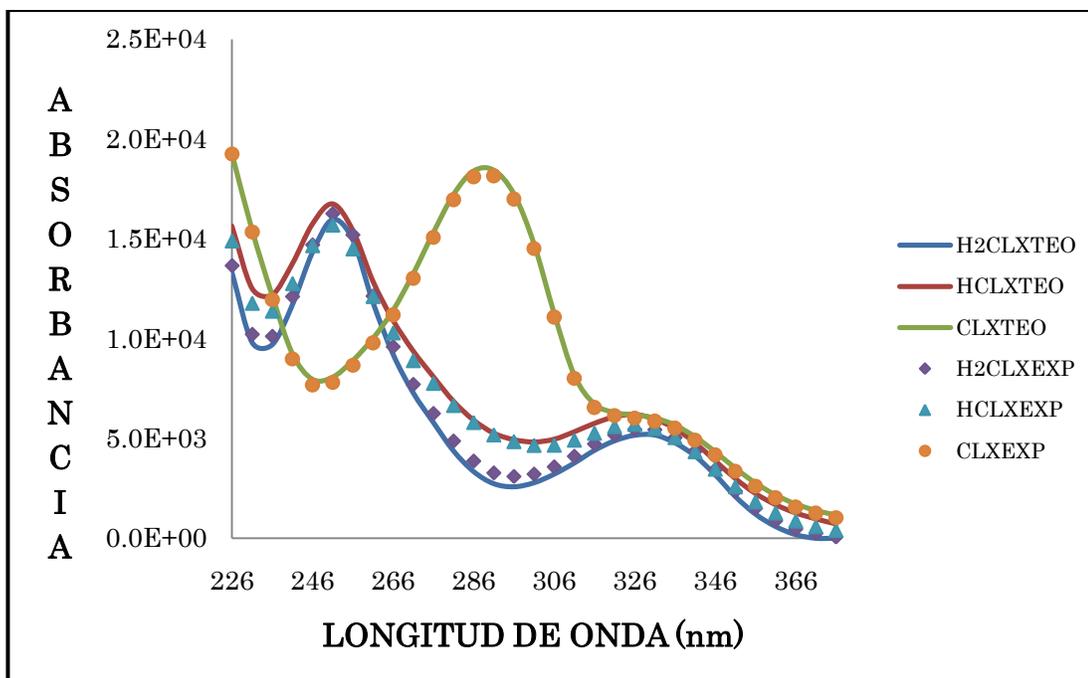
GRÁFICA A12 ESPECTROS DE ABSORCIÓN  
SIMULADOS vs EXPERIMENTALES DEL H<sub>2</sub>XCL<sup>+</sup> PARA MEDIO  
ACUOSO



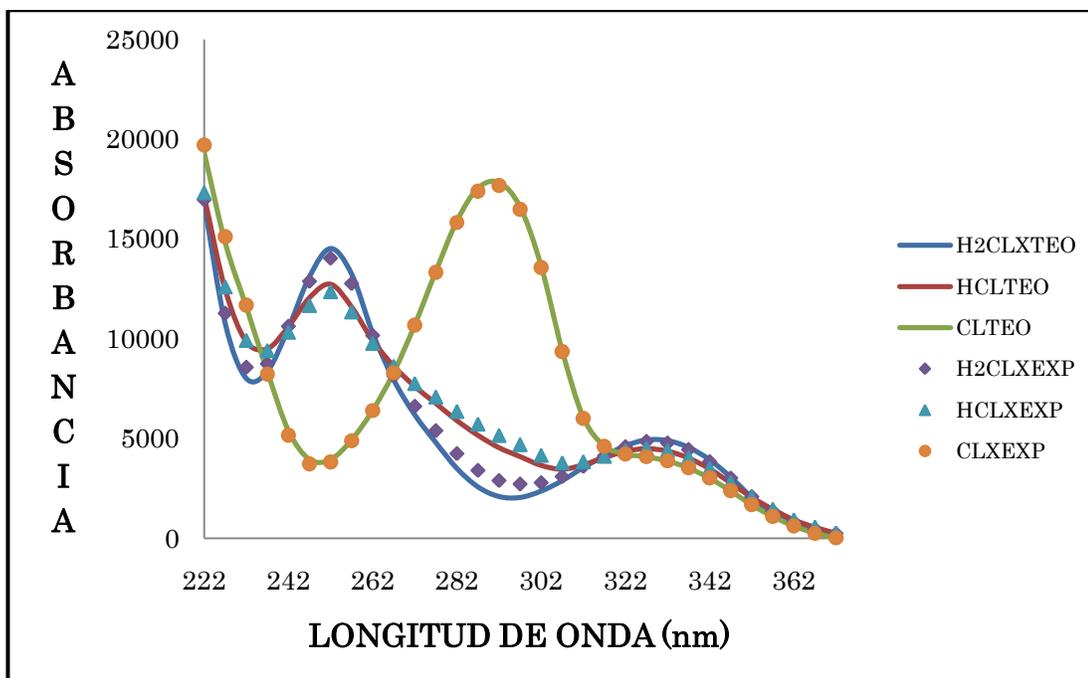
**GRÁFICA A13 ESPECTROS DE ABSORCIÓN  
SIMULADOS vs EXPERIMENTALES DEL  $H_2XCL^+$  PARA UN SISTEMA  
AL 10% DE ETANOL**



**GRÁFICA A14 ESPECTROS DE ABSORCIÓN  
SIMULADOS vs EXPERIMENTALES DEL  $H_2XCL^+$  PARA UN SISTEMA  
AL 20% DE ETANOL**



**GRÁFICA A15 ESPECTROS DE ABSORCIÓN  
SIMULADOS vs EXPERIMENTALES DEL  $H_2XCL^+$  PARA UN SISTEMA  
AL 30% DE ETANOL**



**GRÁFICA A16 ESPECTROS DE ABSORCIÓN  
SIMULADOS vs EXPERIMENTALES DEL  $H_2XCL^+$  PARA UN SISTEMA  
AL 40% DE ETANOL**

## ANEXO V

**TABLA No.A4 VALORES CALCULADO PARA LAS  
CONSTANTES DIELECTRICAS DE LA MEZCLAS  
ETANOL-AGUA EMPLEADAS EN LA  
PARTE EXPERIMENTAL A T= 25°C**

<b>% Et OH</b>	<b><math>\epsilon</math></b>
0	78.07
10	73.49
20	68.70
30	63.70
40	58.48

## 9. REFERENCIAS

1. [http://es.wikipedia.org/wiki/Antiinflamatorio\\_no\\_esteroide](http://es.wikipedia.org/wiki/Antiinflamatorio_no_esteroide)  
12/05/2009.
2. Palafox Saldaña, Guillermina *Determinación del coeficiente de reparto y constante de acidez del clonixinato de lisina: un reciente analgésico antiinflamatorio no esterooidal.* Tesis que para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga Facultad de Química México D.F. (1998).
3. Raymond C. Rowen, Paul J. Sheskey, Paul J. Weller *Handbook of pharmaceutical excipients* American Pharmaceutical press 4ta ed. 2003. Washington.
4. Morales Pérez, Adriana. *Estudio de sistemas químicos multirreaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa SQUAD y otros métodos computacionales.* Tesis que para obtener el grado de maestro en Ciencias Físicoquímicas. FES Cuautitlán EDOMEX (1993).

5. Hernández Matamoros, Pablo. Métodos de separación para el análisis químico y el desarrollo tecnológico: "Estudio espectrofotométrico de un nuevo complejo picrato de litio-eter corona (tetraciclohexan (b,e,h,k) (1,4,7,10) tetraoxaciclododecano) por métodos computacionales". Tesis que para obtener el Título de Químico presenta. FES Cuautitlán EDOMEX (1997).
6. Noyola Rivera, Armando. Determinación espectrofotométrica de las constantes de acidez de un azocompuesto nuevo, 2-fenilazo-4-fenilfenol, en mezclas agua-etanol mediante métodos computacionales. Tesis que para obtener el título de Ingeniero Químico FES Cuautitlán EDOMEX (2002)
7. Sheldlovsky, T., B. Pesce (Ed), Electrolyte, Pergamon, New York, (1962).
8. Yasuda, M., Bull. Chem. Soc. Jpn., 32, 429, (1959)
9. Pineros. I. P, Ballesteros, J.L. Lastres Extraction and LC determination of lisine clonixinate salt in water/oil microemulsions. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 27:747-754. (2002)
10. Murray K., Robert Bioquímica de Harper Ed. El manual moderno México D.F. (1994)

11. Villatoro Álvarez Néstor *Validación de un método analítico para determinar contenido químico del clonixinato de lisina y ketorolaco trometamina en una solución inyectable por cromatografía de líquidos de alta resolución.* Tesis que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. FES Cuautitlán EDOMEX (2009).
12. Bautista Méndez, Heriberto. *Desarrollo y validación de la metodología analítica para la cuantificación de clonixinato de lisina en diferentes formas farmacéuticas.* Tesis que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. FES Zaragoza México D.F. (1998)
13. Guevara Guadarrama, José Luis. Werner Camarena I. Ricardo. *Estudio Monográfico del clonixinato de lisina.* Tesina Profesional que para obtener el Título de Cirujano Dentista Facultad de Odontología México D.F. (1996).
14. Nieto García, Leticia. Villaseñor Solis, Alma Cristina. *Desarrollo y Validación de un método analítico para la determinación del CL y Diclofenaco sódico por electroforesis capilar.* Tesis que para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo presenta. FES Cuautitlán EDOMEX.
15. Patente USP 3, 973, 027
16. Vila Jato, José. *Tecnología Farmacéutica Vol. I* Ed. Síntesis Madrid, España (2001)

17. Mark, Gibson. *Pharmaceutical preformulation and formulation a practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form.* Edite by Mark, Gibson
18. Aiache J.M. *Biofarmacia* Ed. El manual moderno. México, D.F.(1983)
19. Harris C., Daniel. *Análisis químico cuantitativo.* Ed. Grupo Editorial Iberoamericana. México (1992).
20. L. Roman, S. Mirel, E. Florean, R. Operan, J. Phar, and Biom Anal. 18, 137 (1998)
21. Hartley, F.R., C. Burgess, R. Alcock. *Solution equilibrant,* John Wiley & Sons, New York (1980)
22. Popovych, O., R.P.D. Tomkins, *Nanoqueous solution chemistry,* John Wile and Sons, New York, (1981)
23. Izmailov, N.A., V.N. Izmailova, Zh. Fiz Kchim. 29,1050 (1955)
24. Rived, F.,M. Rosés, E. Bosh, Anal.Chim. Acta., 374,309 (1998)
25. Rived, F., I. Canals, E.Bosch M, Rosis, Anal.Chim Acta., 439, 315 (2001)
26. Barbosa,J.,R. Bergés, I. Toro, V. Sans-Nebot, Int. J. Pharm., 149, 213 (1997)
27. Marcus, Y., Y. Migron, J. Phys. Chem., 95, 400 (1991)
28. Chatterjee, P., S. Bagchi, J. Phys. Chem., 95, 3311 (1991)
29. Barbosa, J., I. Toro, V. Sanz-Nebot, Anal. Chim. Act, 347, 295 (1997)

30. Barbosa, J., D. Barrón, R. Bergés, S. Buti, V. Sans-Netbot, *Int. J. Pharma.* 160,173 (1998).
31. Barbosa, J., G. Fonrodona, I. Marquéz, V. Sans-Netbot, I. Toro, *Anal. Chim. Acta.*, 351,397 (1997)
32. Barbosa, J., I. Márquez, G. Fonrodona, D. Barrón, R. Bergés, *Anal. Chim. Acta.* 347,385 (1997)
33. Juan, A., G. Fonrodona, E. Casassas. *Treds in analytical chemistry* 16, 52 (1997)
34. Reicharolt, C. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, 2a. ed, VCH, New York (1988)
35. Kamlet, M.J., J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, *J. Org. Chem.* 48, 2877 (1983)
36. Dimroth K.,Reichardt C. Siepmann T. and Bohlmann F.Liebigs. 7; 2<sup>nd</sup> edition. Verlag Chemie, Wienheim, 1988
37. Alev Doğan, Fitnat Köseoğlu, and Esmâ Kilic. *Studies on the macroscopic protonation constants of some  $\alpha$ -amino acid in ethanol-water mixtures.* *Analytical Biochemistry* 309, 75-78, 2002
38. Onsager, L. *Journal of American Chemical Society.* 1938, 58, 1486 (1936).
39. Kirkwood, J.G. *The journal of chemical Physics.* 2, 1936.