

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

**Estudio de un Método Directo para Titular
Aminoácidos y Sales de Amonio**

TESIS
Que para su Examen Profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO
presenta
Nilo Gadea Salgado

TIPOGRAFICA ORTEGA
Siempreviva 99 - (Col. Xotepingo)
México, D. F. 1958





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis queridos padres:

Sr. CARLOS GADEA GUTIERREZ
Sra. CONCEPCION S. de GADEA,

Con inmenso cariño e infinita gratitud,
quienes con su abnegación y sacrificio hicieron
posible la culminación de mis estudios.

A mi admirable abuela SILVANA.

Con gran admiración

α mis HERMANOS.

Con verdadera sinceridad

α mis COMPAÑEROS Y AMIGOS.

Al Prof. Dr. F. L. HAHN,

con todo respeto y agradecimiento
por su acertada dirección en la
realización de este trabajo.



Respetuosamente al H. Jurado:

Sr. Prof. Dr. F. L. HAHN
Sr. Quím. OTHON CANALES V.
Sr. Ing. Quím. GUILLERMO CORTINA A.
Sr. Q. F. B. JOSE ORIGEL S.
Sr. Q. F. B. NICOLAS KAHUAN G.

**ESTUDIO DE UN METODO DIRECTO PARA TITULAR
AMINOACIDOS Y SALES DE AMONIO.**

S U M A R I O

- I.—MOTIVOS DEL ESTUDIO Y GENERALIDADES
- II.—CUANTEO DE AMINOACIDOS Y SALES DE AMONIO
- III.—CALCULO DE CONSTANTES DE DISOCIACION DE ACIDOS Y BASES DEBILES A BASE DE TITULACIONES POTENCIOMETRICAS.
- IV.—ENSAYOS PRACTICADOS.
- V.—RESUMEN.
- VI.—BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

MOTIVOS DEL ESTUDIO. GENERALIDADES

El estudio que aquí se presenta se ha practicado con la intención de elaborar, si fuera posible, un método rápido y sencillo para determinar la cantidad de aminoácidos presentes en hidrolizados de materiales proteicos o también en productos comerciales, como por ejemplo el ácido glutámico, que hoy en día se usa en cantidades relativamente importantes como sustancia aromatizante en productos alimenticios.

Para demostrar la importancia del problema se presenta primero, una ligera reseña y de ningún modo completa acerca de la importancia fisiológica de los aminoácidos y luego se reseñan los métodos más importantes que se usan para cuantearlos.

Formación y propiedades de los Aminoácidos.

Los aminoácidos son las sustancias que resultan de la disgregación (hidrólisis) de las proteínas.

La disgregación de las proteínas se lleva a efecto por medio de la hidrólisis, la cual puede ser total hasta llegar a las sustancias constituyentes los "aminoácidos" o hidrólisis parcial, obteniéndose productos de degradación relativamente pequeños (dipéptidos, tripéptidos).

La hidrólisis de las proteínas se realiza: 1) por ebullición con ácidos minerales o álcalis fuertes a la presión atmosférica o a presiones mayores; 2) tratándolas con ciertos ácidos sulfónicos

de larga cadena (ácido cetil sulfónico); 3) por digestión con enzimas proteolíticas.

Tanto la hidrólisis ácida como la alcalina, afecta a varios de los aminoácidos que se forman, como por ejemplo el triptófano (ácida) la cistina, cisteína, arginina (alcalina) y otros más.

La hidrólisis enzimática no tiene los inconvenientes de la ácida ni de la alcalina, pero necesita más tiempo para efectuarse y pocas veces es completa.

Los aminoácidos derivados de las proteínas son todos α aminoácidos. En todos ellos a excepción de la glicina el átomo de carbono combinado con el radical "NH₂" es asimétrico, por lo que estos ácidos son ópticamente activos.

Son sustancias cristalinas y de color blanco, siendo la forma de los cristales característicos de cada uno de ellos.

Son solubles en agua, excepto la cistina y la tirosina; a excepción de la prolina son insolubles en alcohol y ninguno es soluble en el éter; forman sales cristalinas con las bases metálicas; algunos de ellos tienen sabor dulce (glicina, alanina, serina) otros como el triptófano carecen de sabor; existiendo otros de sabor amargo como la arginina.

Los aminoácidos tienen propiedades anfotéricas, por tener grupos carboxílicos y amínicos.

Importancia biológica de los Aminoácidos.

Las proteínas se descomponen por completo, en la alimentación animal dentro del interior del aparato digestivo, dejando en libertad los aminoácidos que las constituyen al actuar sobre ellas las enzimas proteolíticas. (4).

Desde hace muchos años se demostró la posibilidad de reemplazar las proteínas por aminoácidos, usando hidrolizados de proteínas con aminoácidos que se sabía eran destruidos en los procesos proteolíticos. Esta demostración terminó en los métodos experimentales tanto para el hombre como para los animales, que utilizan mezclas de aminoácidos en varios casos obtenidos por

síntesis, reemplazando a las proteínas en las dietas alimenticias que se utilizaron para la experimentación.

Hay ciertos aminoácidos que son necesarios para la alimentación y que el organismo no puede sintetizar, éstos deben encontrarse en los alimentos que se ingieren y por lo tanto se llaman indispensables o esenciales.

BLOCK (1) ha sugerido la siguiente clasificación de los aminoácidos refiriéndose a su esencialidad y dispensabilidad para la vida.

Clasificación de BLOCK

ESENCIALES

Histidina
Lisina
Triptófano
Fenilalanina
Metionina
Treonina
Leucina
Isoleucina
Valina
Cistina
Tirosina
Arginina
Glicina

NO ESENCIALES

Acido glutámico
Alanina
Acido aspártico
Serina
Prolina
Hidroxiprolina

Estudio metabólico de algunos Aminoácidos.

Glicina.

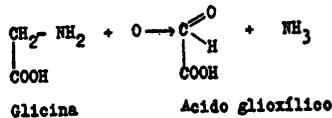
La glicina además de formar parte de varias proteínas del organismo y de encontrarse en forma libre en el hígado (ácido glicocólico) interviene en la síntesis de productos no proteínicos

como, a) la creatinina de los músculos, y el glutatión de las células, b) el ácido hipúrico.

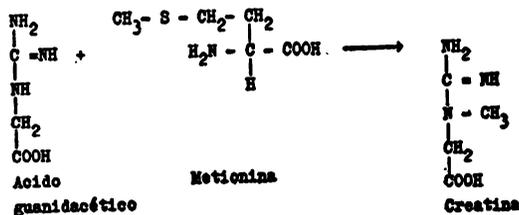
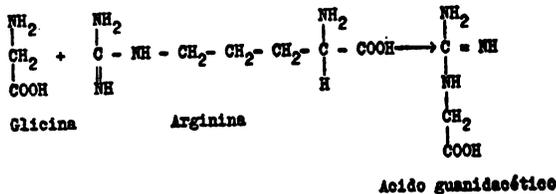
La glicina puede ser sintetizada por la rata y el hombre adulto, pero llega a ser insuficiente para un máximo desarrollo, siendo por lo tanto esencial en la dieta de ambos. Se ha demostrado que la dieta del pollo necesita para su adecuada alimentación aproximadamente el 1 por 100 de glicina.

La velocidad a que se realiza la síntesis de la glicina en el organismo humano ha sido calculada por Quick aproximadamente 0.5 g. por hora, basándose en la eliminación del ácido hipúrico después de la administración de benzoatos.

Son pocos los conocimientos que se tienen acerca de la degradación metabólica de la glicina; los estudios efectuados en tejidos han dado poca información, los tejidos animales contienen una enzima flavoproteínica que cataliza la oxidación de la glicina hasta ácido glioxílico y amoníaco.



Es de interés el papel que desempeña la glicina en la síntesis biológica de la creatina por la unión con la arginina y la metionina.



La glicina interviene en la síntesis del glutatión que desempeña su papel en las oxidaciones y reducciones intracelulares. También toma parte en la síntesis de la hemina humana, lo que se ha comprobado por el hecho de que al administrar glicina marcada con el isótopo 14 (radiactivo) del carbono, la hemina aislada de los glóbulos rojos contiene carbono isotópico.

METIONINA.

Es un aminoácido que contiene azufre y no puede ser sintetizado por el organismo partiendo de las sustancias de la dieta, siendo preciso ingerirla para mantener el equilibrio nitrogenado en el hombre adulto.

La metionina puede satisfacer todas las necesidades de azufre del organismo, ya que se convierte en cistina en los tejidos.

La transmetilación es importante función metabólica de la metionina. DU VIGNEAUD 2) ha demostrado que el organismo animal es incapaz de sintetizar los grupos metílicos necesarios para la metilación de ciertos compuestos del organismo que contienen azufre y nitrógeno, dependiendo de la presencia en los alimentos de esos grupos metílicos.

En la síntesis biológica de la creatina, el grupo metílico deriva de la metionina por transferencia.

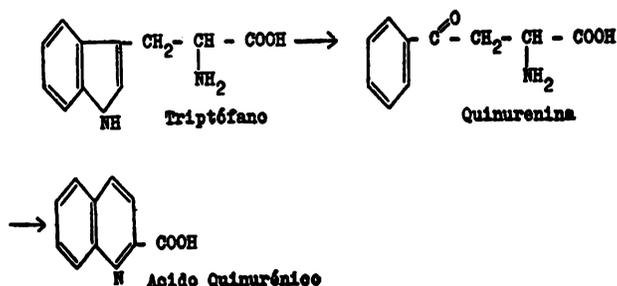
Además de las funciones metabólicas, la metionina parece desempeñar papel importante en la protección del hígado contra algunos venenos como el arsénico, fósforo, tetracloruro de carbono.

TRIPTOFANO.

Es un aminoácido indispensable para el desarrollo de los animales jóvenes y para el mantenimiento del equilibrio de nitrógeno en el hombre adulto.

Su transformación metabólica se realiza por la oxidación has-

ta ácido quínurénico pasando por la quinurenina. El moho rojo del pan *neurospora* puede sintetizar el triptófano a partir del indol y de la serina.



FENILALANINA Y TIROSINA.

Estos aminoácidos tienen relaciones metabólicas algo análogas por lo que pueden considerarse juntos (3).

La fenilalanina no puede ser sintetizada por el organismo, por lo que se necesita encontrarse presente en la alimentación.

Las necesidades de la tirosina, pueden compensarse con la fenilalanina, porque ésta puede convertirse en tirosina en el organismo.

Son aminoácidos cetogénicos, es decir, que originan ácido acetil acético; sin embargo, se pretende que después de la pérdida de nitrógeno eliminándose como urea la fenilalanina y la tirosina serían oxidados hasta dar anhídrido carbónico y agua, formándose intermedariamente ácido acetilacético.

Por las experiencias llevadas a cabo por Block y Raper, parece que el pigmento melanina está en estrecha relación con el metabolismo de la tirosina.

La melanina no es una substancia homogénea sino una mezcla de pigmentos de composición no muy bien definida; es un pigmento de la piel que lo tiene en escasa cantidad y en el cual puede faltar por completo "albinismo". Se produce en abundancia

en la enfermedad de Addison (diabetes bronceada) produciéndola también en exceso los tumores melánicos.

Block expuso que la piel contenía una enzima capaz de convertir la 3-4-dihidroxifenilalanina en una sustancia parecida a la melanina, la cual faltaba en la piel de los albinos; según Raper la tirosina es el aminoácido precursor de la 3-4-dihidroxifenilalanina.

LISINA.

Es un aminoácido esencial para el desarrollo de los animales jóvenes, así como también para mantener el equilibrio nitrogenado en el hombre adulto.

Se diferencia de los demás aminoácidos en que no parece capaz de obtener su nitrógeno de otras fuentes alimenticias.

Sin embargo, la lisina puede contribuir a la formación de otros aminoácidos, después de la desintegración oxidante siendo ésta reversible; esto se comprueba por la imposibilidad de substituir la lisina en las dietas experimentales con el cetoácido ni con el hidroxíácido derivados de ella.

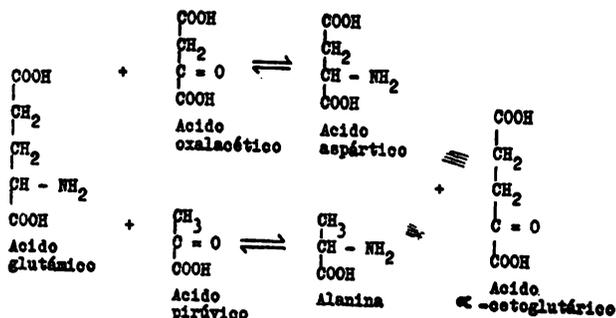
ACIDO GLUTAMICO.

Es un aminoácido dicarboxílico que se encuentra en grandes cantidades en muchas proteínas vegetales y animales.

Puede sintetizarse fácilmente en el organismo, por lo que puede omitirse en la alimentación. Es probable, sin embargo, que lo fácil de su síntesis en los tejidos contribuya al importante papel que desempeña en el proceso general del metabolismo nitrogenado en el interior de las células.

La participación en las reacciones de transaminación, efectuada por Cohen y Green es un aspecto metabólico de importancia del ácido glutámico; reacciona con el ácido pirúvico o el ácido oxalacético para producir ácido α -cetoglutámico, y los aminoácidos alanina o ácido aspártico. Estas reacciones son reversibles

de modo, que el ácido glutámico puede sintetizarse partiendo del ácido α -cetoglutarico y la alanina o el ácido aspártico.

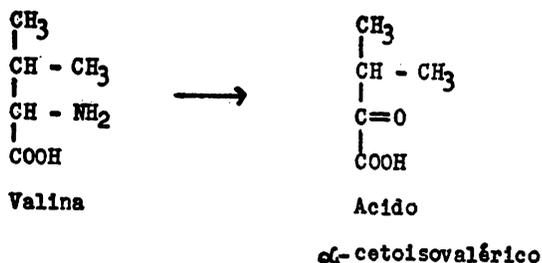


Las enzimas que catalizan estas reacciones han sido aisladas de los tejidos animales, creyéndose que contienen un derivado de la piridoxina como grupo prostético.

VALINA.

De este aminoácido se requiere cierta cantidad en la alimentación, como se ha comprobado por estudios realizados en los animales; mantiene el equilibrio nitrogenado en el organismo.

La posibilidad de un proceso metabólico es el que supone la desaminación; para formar ácido α -cetoisovalérico, ya que dicho producto puede reemplazar a la valina en las dietas experimentales.



CAPITULO II

CUANTEO DE LOS AMINOACIDOS Y SALES DE AMONIO.

Una determinación global de los aminoácidos o de sus productos de condensación "los prótidos" puede practicarse evidentemente conforme a los métodos generales usados en análisis de sustancias orgánicas, convirtiendo el nitrógeno de estos compuestos en amoníaco (sulfato de amonio) conforme al procedimiento conocido de Kjeldahl, siguiendo a esta "mineralización del nitrógeno" la destilación y determinación volumétrica del amoníaco. No se tratará aquí detalladamente este método ampliamente conocido y de ningún modo específico para aminoácidos.

Especialmente para éstos se usan dos métodos:

Primero: Procedimiento gas-volumétrico de Van Slyke (5).

Consiste en diazotar los aminoácidos en solución ácida mediante adición de nitrito de modo que se desprende su nitrógeno en forma elemental, gaseosa; agregando un oxidante, generalmente bicromato de potasio se oxidan los gases nitrosos que pueden haberse desprendido de modo que el único producto gaseoso formado es el nitrógeno; midiendo, manométricamente, su cantidad se obtiene la cantidad correspondiente de aminoácidos (9).

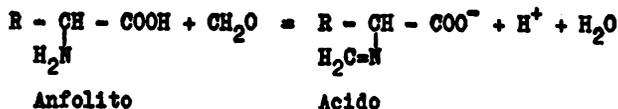
Este método es muy exacto y se usa ampliamente en aquellos laboratorios, clínicos o fisiológicos en los que las determinaciones de aminoácidos se practican a menudo, de suerte que es

posible adquirir el instrumental correspondiente, bastante caro y además delicado en su manejo; de ahí resulta asimismo que este método es útil solamente en casos de que se practique a menudo, ya que sólo puede ser practicado por un operador especializado que continuamente mantenga su habilidad y experiencia.

El segundo método, cuyos fundamentos constituyen la base para una modificación deseable que se ha buscado en este trabajo, se debe a S. P. L. Soerensen (6).

Es éste el método más sencillo y antiguo que existe, que permite cuantear los aminoácidos combinando el grupo "-NH₂" que todos ellos contienen y en que radica la función básica con formalina, con lo cual perdiéndose la función básica se acentúa el carácter ácido, de modo que los compuestos "metilenoiminoácidos", que se forman pueden titularse como un ácido orgánico cualquiera.

Esquemáticamente la reacción se representa por:



Es evidente que practicando esta reacción debe observarse estrictamente algunas precauciones, para que los valores obtenidos sean exactos. La reacción formulada es reversible hasta cierto grado; por esta razón debe agregarse un exceso suficiente de formaldehído, lo que incluye inmediatamente la condición de que este reactivo auxiliar sea absolutamente neutro; también la reacción ácida que se establece puede ser la causa de que la reacción no llegue a ser completa, hasta haberse neutralizado por lo menos la mayor parte de este ácido titulable.

Una de las fórmulas que se recomiendan para esta titulación, sugerida primero por S. P. L. Soerensen es la siguiente:

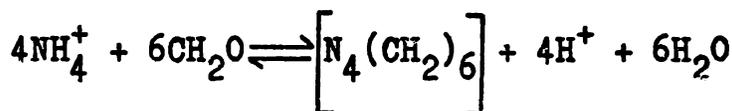
A la solución de aproximadamente 25 ml. y 0.1 N en amino-

ácidos libres se le agrega 5 ml. de formalina, previamente neutralizada con hidróxido de sodio, después de lo cual se titula con hidróxido de sodio, hasta que el indicador vire a la coloración marcadamente rosada (pH aproximadamente de 9).

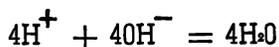
La fórmula tal como queda indicada admite cierta duda acerca de si la fenolftaleína (cuyo vire empieza en pH 8,0) es el indicador más propio para esta titulación; efectivamente se ha encontrado que es mejor para el presente caso el uso de la timolftaleína.

Conceptos similares pueden aplicarse para la determinación de las sales de amonio, que puede practicarse sin destilar previamente el amoníaco liberado por medio de un álcali fijo. Una sal de amoníaco o sea el ión de amonio, reacciona con la formalina formándose la exametilentetramina, base bastante débil y ácido libre.

Las reacciones fundamentales de este procedimiento son:



Esta reacción, como queda indicado en la fórmula que antecede, es notablemente reversible y se completa conforme la titulación va progresando, es decir con la adición de álcali.



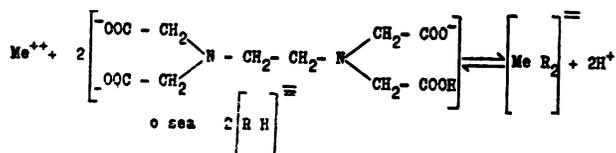
de modo que a cada mol de ión amonio corresponde un mol de hidróxido de sodio gastado en la titulación.

Esencialmente en ambos casos se usan dos reactivos para determinar la reacción cuantitativa: Primero; uno que se agrega en exceso no determinado con el fin de formar el compuesto titulable y segundo; el reactivo propiamente dicho, hidróxido de sodio, con el cual se efectúa la titulación.

La idea fundamental del estudio cuyos resultados se relatan a continuación, ha sido la de unir estos dos reactivos en una sola

solución con el fin de obtener en el punto final de la titulación una relación invariable, en todos los casos, entre las cantidades que se agregan de cada uno de ambos reactivos. Además se evitaría de este modo el inconveniente, de que el formaldehído que siempre contiene ácidos, debe neutralizarse previamente; si el reactivo único que se usa se compone de formaldehído con un exceso de álcali, exceso que se determina fácilmente titulando mediante este reactivo algún ácido valorado, se simplifica mucho el método a seguir.

Para este modo de proceder se conocen antecedentes: si el ácido etilendiaminotetracético, en forma de su ión terciario, reacciona con un ión alcalinotérreo, se desprenden iones hidrógeno (Me = Ca o Mg, etc.).



Una sal alcalinotérrica neutra produce, debido a esto, reacción notablemente ácida con la solución del reactivo de por sí notablemente alcalino y hasta con una solución mezclada de las sales cuaternaria y terciaria del mismo ácido, reactivo fuertemente alcalino (pH 10,2 a 10,3); tan pronto como la totalidad del metal presente haya entrado en la formación del complejo la solución titulada vira al alcalino se basa en esta serie de reacciones un método alcalino exacto y cómodo para la determinación de sales alcalinotérricas (7).

La modificación esbozada en la forma de titular, consiste en aplicar el reactivo auxiliar y el álcali en una solución premezclada ofrece además la posibilidad de obtener, en la misma titulación algunas indicaciones útiles acerca de las propiedades del ácido combinado que se forma, especialmente de su constante de disociación.

El propósito de este trabajo era estudiar mediante titulaciones potenciométricas, tanto la neutralización progresiva, mediante una solución valorada de hidróxido de sodio, de una solución de un aminoácido que contiene un exceso apropiado de formalina, como por otro lado la neutralización del ácido solo, mediante un reactivo que contiene a la vez formalina e hidróxido de sodio.

A base de tales ensayos puede determinarse la constante de disociación "aparente" del ácido que se titula.

"Constante aparente" significa que en nuestro caso se puede suponer que, aplicando los métodos que sirven para determinar las constantes a diferentes fases de la titulación, pueden observarse diferentes valores para la constante, ya que la constitución del ácido que se titula puede variar según el grado de la neutralización.

Fundamentalmente existen dos posibilidades diferentes para determinar la constante:

La primera se basa en el hecho de que en una solución equimolar de un ácido y su sal el "pH" es numéricamente igual al "pK" del ácido (el pK es el logaritmo negativo de la constante).

La segunda posibilidad se basa en que la variación del pH que se observa desde un punto de la titulación antes de llegar al vire hasta otro punto de la titulación, después de haberlo rebasado es tanto mayor cuanto mayor sea la constante, lo que significa, cuanto menor sea el "pK".

Si estos dos métodos coinciden en sus resultados se pueden deducir que se ha titulado un ácido definido e invariable y en caso de que se obtengan valores diferentes con estos dos métodos, cabe la conclusión de que el ácido haya variado en sus propiedades en el transcurso de la titulación.

A base de tales observaciones es posible determinar las condiciones óptimas para la determinación práctica; una vez encontradas estas determinaciones ya no pueden presentar mayores dificultades que en la determinación volumétrica del ácido acético o de otro ácido similar.

En el capítulo que sigue se exponen primero; las bases teóricas para la interpretación de las mediciones que se practican.

CAPITULO III

CALCULO DE CONSTANTES DE DISOCIACION DE ACIDOS Y BASES DEBILES A BASE DE TITULACIONES POTENCIOMETRICAS

Según una fórmula conocida el "pH" de una solución reguladora, compuesta de un ácido débil mezclado con una de sus sales se determina por:

$$1) \text{pH} = \text{pK} + \log \frac{b}{a} = \text{pK} + \log b - \log a$$

en donde,

"pK", es el logaritmo negativo de la constante de disociación.

"a", la concentración del componente ácido (ácido libre).

"b", la concentración del componente básico (la sal).

La misma fórmula puede aplicarse a bases débiles, siendo en este caso la constante de equilibrio: $K = 14 - K_a$ y el componente ácido la sal de la base, el componente básico la base libre.

La condición necesaria para que esta fórmula pueda aplicarse, es solamente que la solución contenga ambos componentes en cantidades hasta cierto grado comparables, de modo que la presencia del ácido libre suprima la hidrólisis de la sal y la presencia de ésta impida la disociación del ácido.

Ahora bien; en el transcurso de una titulación potenciométrica, se miden los valores del "pH" que corresponden a diferentes mezclas de ácido con sal, empezando con el ácido puro hasta llegar a la sal pura en el punto final; siendo:

"x", el volumen de reactivo (NaOH) que se gasta hasta el punto final, y

"v", el volumen agregado en cierto punto de la titulación, con lo cual "v" corresponde a la cantidad de la sal formada, y

"x - v" a la cantidad de ácido todavía libre.

El cociente $\frac{v}{x-v}$ de la fórmula 1) resulta por lo tanto, igual a

$\frac{v}{x-v}$, y de esto se deduce:

$$2) \text{pH}_- = \text{pK} + \log \frac{v_-}{x - v_-}$$

Se ha aplicado un subíndice "-" para significar que lo que antecede a la parte de la titulación antes de llegar al vire.

Por otra lado pasando éste, se tiene hidróxido de sodio en exceso, cuya concentración es:

$$\frac{v_+ - x}{V_+} C, \text{ siendo " } V_+ \text{ " el volumen total y}$$

"C" la concentración del reactivo usado; de esto tenemos:

$$\text{oh} = \frac{v_+ - x}{V_+} C; \quad \text{h} = \frac{10^{-14}}{v_+ - x} \cdot \frac{V_+}{C}; \quad \text{y}$$

$$3) \text{pH}_+ = 14 + \log (v_+ - x) + \log C - \log V_+$$

combinando (2) y (3) tenemos:

$$4) \text{pH}_+ - \text{pH}_- = 14 + \log (v_+ - x) + \log C - \log V_+ \\ - \text{pK} + \log (x - v_-) \quad - \log v_-$$

y con eso:

$$5) \text{pK} = 14 - \Delta\text{pH} + \log (v_+ - x) + \log (x - v_-) + \log C \\ - \log V_+ - \log v_-$$

siendo Δ pH la diferencia entre los dos valores del "pH" que corresponden a las cantidades de reactivo antes y después del vire, " v_1 " y " v_2 ".

El valor de "x" se determina en la misma titulación (gasto de reactivo hasta el vire); con esto se puede calcular la constante, con la sola condición de que las VARIACIONES del pH se midan correctamente; sus valores absolutos no tienen importancia.

Ejemplo:

DETERMINACION DEL pK DE UN ACIDO CONOCIDO

Titulación de ácido acético con hidróxido de sodio 0.1 N. Al empezar la titulación el reactivo en la bureta estaba en 3,22 ml.; este valor debe restarse de todas las lecturas.

Las lecturas indicadas en la tabla que sigue (tabla No. 1) se tomaron después de haberse acercado al punto final, supuesto hasta más o menos 3 ml.

TABLA No. 1.

Lectura.	v	x — v	pH	100	Δ pH
21,0 ml	17,78	3,33	5,59		
				15	
22,0	18,78	2,33	5,74		
				17	
22,5	19,28	1,83	5,91		
				18	
23,0	19,78	1,33	6,09		
				19	
23,5	20,28	0,83	6,28		
				41	
24,0	20,78	0,33	6,69		
				341	
24,5	21,28	0,17	10,10		
				110	
25,0	21,78	0,67	11,20		
				24	
25,5	22,28	1,17	11,44		
				13	
26,0	22,78	1,67	11,57		
				27	
27,0	23,78	2,67	11,84		
				4	
28,0	24,78	3,67	11,88		
				5	
30,0	26,78	5,67	11,93		
				29	
35,0	31,78	10,67	12,22		

La precisión de los potenciómetros usuales se indica con $\pm 0,02$ del "pH" en la medición de un valor individual del potencial y este error cometido puede rebasarse fácilmente por causas casuales.

Por esta razón el error de variaciones de potencial (suma de

dos valores individuales) llega fácilmente a 0,04 o también algo más, lo que explica la irregularidad de las variaciones antes y después de 26 (22,78) ml.

El efecto que producen tales errores inevitables puede eliminarse mediante el cálculo siguiente:

Para determinar el punto final, se considera volúmenes de reactivo con sus potenciales correspondientes seleccionados en tal forma que encierren tres variaciones del "pH" de las que las dos extremas sean notablemente menores que la intermedia, por ejemplo:

$v = 19,78$	$20,78$	$21,78$	$22,78$
100	$\Delta pH = 60$	451	37

Según un método sugerido por F L. Hahn (7); el punto final puede calcularse a base de la relación que existe entre las dos variaciones del "pH" contiguas a la máxima.

$$Q = \frac{37}{2 \times 60} = 0,31 \text{ es la alícuota de una porción de reactivo}$$

agregado (a saber: 1 ml. en este caso) que faltó todavía en 20,78 ml.

Por lo tanto "x" = 20,78 + 0,31 = 21,09=21,1 ml.

Cálculo de la constante de disociación.

Para el cálculo siguiente los volúmenes pueden aproximarse a una cifra decimal; el volumen inicial de la solución titulada era de 25 ml. donde tenemos:

"V" = v + 25. Con esto se obtienen los siguientes valores por introducirse en la fórmula (5)

" V " = v + 25. Con eso se obtiene los siguientes valores por introducirse en la fórmula (5)

$v_+ = 22,8$	$v_+ = 47,8$	$v_- = 19,8$	$pH_+ = 11,57$
a)			
$v_+ - x = 1,7$		$x - v_- = 1,3$	$pH_- = 6,09$
			$\Delta pH = 5,48$

$v_+ = 23,8$	$v_+ = 48,8$	$v_- = 19,8$	$pH_+ = 11,84$
b)			
$v_+ - x = 2,7$		$x - v_- = 1,3$	$pH_- = 6,09$
			$\Delta pH = 5,75$

Empleando la fórmula (5), para los primeros valores en a)

$pK = 14 - \Delta pH = 14 - 5,48 = 8,52$
$\log (v_+ - x) = 0,231$
$\log (x - v_-) = 0,114$
$\log C \quad \quad \quad -1$
$7,865$
a)

$\log v_+ = 1,679$	$7,865$
$\log v_- = 1,297$	$- 2,976$
$2,976$	$4,88$

$pK = 4,88$

Para los segundos valores tenemos en b)

$pK = 14 - \Delta pH = 14 - 5,75 = 8,25$
$\log (v_+ - x) = 0,431$
$\log (x - v_-) = 0,114$
$\log C \quad \quad \quad -1$
$7,795$
b)

$\log v_+ = 1,688$	$7,795$
$\log v_- = 1,297$	$- 2,985$
$2,985$	$4,81$

$pK = 4,81$

El término medio que se obtiene comparando los valores obtenidos de "pK" = 4,88 y "pK" = 4,81 nos dá como resultado "pK" = 4,84; según tablas de consulta diferentes autores han encontrado para el ácido acético un valor de: "pK" = 4,75 (10)

Los valores observados con los métodos diferentes concuerdan perfectamente.

La solución usada de hidróxido de sodio no era exenta completamente de carbonato de sodio, lo que hace disminuir hasta cierto grado la variación del pH que se observa, con lo cual se observa un valor ligeramente superior del "pK".

Sin embargo teniendo en cuenta que un ensayo de esta clase necesita no más que media o hasta una hora de trabajo y como reactivo una solución valorada de hidróxido de sodio, resulta que esta manera de trabajar constituye un método valioso para obtener un valor bastante acertado para la constante de disociación de ácidos (o desde luego de bases) no conocidos.

Determinación del "pK" del ácido metiléniminoacético.

Ensayo practicado con glicocola.

Se usó el reactivo sosaformalina (R s-f) 0,1065 N₂O, 1 N

TABLA No. 2

v	pH	100 Δ pH
14	8,50	
		20
15	8,70	
		80
16	9,50	
		140
17	10,90	
		10
18	11,00	

El pH a $v = 15$ es inseguro porque un error mínimo e inevitable de volumen en este punto lo afectaría mucho. Por esta razón, el cálculo del punto de equivalencia debe basarse exclusivamente en las variaciones observadas entre 14 a 15 ml. y 17 a 18 ml.

$$f = \frac{20}{10} = 2,00 ; \quad \log f = 0,301$$

$$\rho = 1,52 \times \log f = 0,46$$

Por lo tanto " x " = 15,46 \approx 15,5 ml

Cálculo de la constante de disociación

	$v_+ = 17$	$v_+ = 27$	$v_- = 15$	$pH_+ = 10,90$
a)	$v_+ - x = 1,5$		$x - v_- = 0,5$	$pH_- = 8,70$
				$\Delta pH = 2,20$

	$v_+ = 17$	$v_+ = 27$	$v_- = 14$	$pH_+ = 10,90$
b)	$v_+ - x = 1,5$		$x - v_- = 1,5$	$pH_- = 8,50$
				$\Delta pH = 2,40$

	$v_+ = 18$	$v_+ = 28$	$v_- = 14$	$pH_+ = 11,00$
c)	$v_+ - x = 2,5$		$x - v_- = 1,5$	$pH_- = 8,50$
				$\Delta pH = 2,50$

Aplicando la fórmula (5) tenemos en a):

$$\begin{array}{rcl}
 \text{pK} = 14 - \Delta\text{pH} = 14 - 2,20 & = & 11,80 \\
 \log (v_+ - x) & = & 0,176 \\
 \log (x - v_-) & = & 0,699-1 \\
 \log C & = & \underline{-1} \\
 & & 10,675
 \end{array}$$

a)

$$\begin{array}{rcl}
 \log v_+ = 1,431 & & 10,675 \\
 \log v_- = 1,176 & & - 2,607 \\
 \hline
 2,607 & & 8,06
 \end{array}$$

$$\text{pK} = 8,06$$

En b) tenemos:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{pK} = 14 - \Delta\text{pH} = 14 - 2,40 & = & 11,60 \\
 \log (v_+ - x) & = & 0,176 \\
 \log (x - v_-) & = & 0,176 \\
 \log C & = & \underline{-1} \\
 & & 10,952
 \end{array}$$

b)

$$\begin{array}{rcl}
 \log v_+ = 1,431 & & 10,952 \\
 \log v_- = 1,146 & & - 2,577 \\
 \hline
 2,577 & & 8,37
 \end{array}$$

$$\text{pK} = 8,37$$

En c) tenemos:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{pK} = 14 - \Delta\text{pH} = 14 - 2,50 & = & 11,50 \\
 \log (v_+ - x) & = & 0,398 \\
 \log (x - v_-) & = & 0,176 \\
 \log C & = & \underline{-1} \\
 & & 11,074
 \end{array}$$

c)

$$\begin{array}{rcl}
 \log v_+ = 1,477 & & 11,074 \\
 \log v_- = 1,176 & & - 2,623 \\
 \hline
 2,623 & & 8,45
 \end{array}$$

$$\text{pK} = 8,45$$

De los tres valores de las constantes obtenemos como término medio $\text{pK} = 8,30$

Comparación del pH final, calculado a base del valor del "pK" observado en una titulación potenciométrica.

Primero: para el ácido acético.

A base del "pK" de un ácido el pH en una solución determinada de la sal sódica del mismo ácido se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\text{pH} = 7 + \frac{1}{2} (\text{pK} + \log C)$$

significando "C" la concentración molecular de la sal disuelta.

Aplicando esta fórmula a la titulación del ácido antes descrita tenemos:

NaOH 0,1N gastado (aproximado) 24 ml.

Volumen final 48 ml.

$$C = 5 \times 10^{-2}$$

$$\log C = 0,70 - 2$$

$$\text{pK} = 4,84$$

$$\text{pH} = 7 + \frac{1}{2} (4,84 + 0,70 - 2) = 8,77$$

$$\text{pH final} = 8,77$$

El punto final correspondiente a la variación máxima del pH se observó entre pH = 6,7 y 10,1; lo que concuerda muy satisfactoriamente, ya que la media de los límites es pH = 8,4

Segundo: para el Acido, Metileniminoacético.

NaOH 0,1N gastado (aproximado) 17 ml.

Volumen final 27 ml.

$$C = 6,3 \times 10^{-2}$$

$$\log C = 0,80 - 2$$

$$\text{pK} = 8,30$$

$$\text{pH} = 7 + \frac{1}{2} (8,3 + 0,80 - 2) = 10,55$$

$$\text{pH final} = 10,55$$

El vire se observó entre $\text{pH} = 9,5$ y $10,9$; obteniendo como media $\text{pH} = 10,2$; lo que también significa una concordancia satisfactoria.

Resumen:

También en este caso se ha encontrado que el cálculo del "pK" a base de la variación del potencial conduce a un valor para el pH del punto final que coincide satisfactoriamente con el pH del vire observado en la titulación potenciométrica. Sin embargo este pH se halla aproximadamente en el valor de $\text{pH} = 10$ (algo más arriba todavía) en tanto que en el caso del ácido acético, el valor es ligeramente arriba de $\text{pH} = 8$.

Resulta de este modo que: el indicador propio para practicar esta determinación no es la fenolftaleína que se ha recomendado para este fin y que vira entre $\text{pH} = 8$ y 10 (según la cantidad que se usa) sino la timolftaleína que vira entre $\text{pH} = 9,4$ y $10,6$, ó mejor todavía el amarillo de alizarina que vira entre $\text{pH} = 10$ y 12 .

Tratándose de ácidos tan débiles, las determinaciones que se practican con indicadores pueden conducir solamente a valores aproximados.

Se consignan en el capítulo siguiente los análisis prácticos que se han efectuado con este método.

CAPITULO IV

ENSAYOS PRACTICADOS

SOLUCIONES Y SUBSTANCIAS USADAS EN LOS ENSAYOS.

Soluciones valoradas de:

Acido Clorhídrico

Hidróxido de sodio

Solución reactivo de Sosaformalina (Rsf)

Substancias ensayadas.

Acido glutámico

Acido aminoacético (glicina)

Acido sulfanílico

Preparación de las soluciones.

Solución 1N de Acido clorhídrico.

Se diluyen aproximadamente 100 ml. de ácido clorhídrico concentrado y puro equivalentes a 1 mol de HCl completándose el volumen a 1,000 ml, obteniéndose así un ácido aproximadamente 1N, al cual se le determina su normalidad exacta valorándolo contra tetraborato de sodio decahidratado. (8)

Solución 1N de Hidróxido de sodio

Se pesan 40 g. de hidróxido de sodio y se disuelven en 100 ml. de agua, llevándose después el volumen a 1.000 ml. determi-

nándose después su normalidad exacta valorándolo contra ácido clorhídrico de normalidad conocida.

Solución reactivo de Sosaformalina (Rsf).

a)	Hidróxido de sodio 1,075N	80 ml.
b)	Formalina	40 ml.
c)	Alcohol	600 ml.
d)	Agua destilada	280 ml.

Normalidad de las soluciones.

1)	Acido clorhídrico	1,0669 N
2)	"	1,243 N
3)	"	0,1172 N
1)	Hidróxido de sodio	0,1219 N
2)	" "	0,1236 N
1)	Reactivo Sosaformalina	0,1001 N
2)	" "	0,1208 N
3)	" "	0,1065 N
4)	" "	0,1018 N

Valoración de las soluciones.

Soluciones de Acido clorhídrico.

Primera valoración con borax.

Pesadas	borax	HCl	Normalidad
a)	1,017 g	5,0 ml.	1,0665
b)	1,028 g	5,05 ml.	1,074

1,0669 N

Segunda valoración con borax.

Pesadas	borax	HCl	Normalidad
a)	1,5296 g	6,45 ml	1,243 N
b)	1,3265 g	5,60 ml	1,243 N

Tercera valoración se efectuó con NaOH 0,1219 N.

Como al agotarse la segunda solución de ácido clorhídrico se disponía de una solución de hidróxido de sodio (1) exactamente conocida se tomó ésta como base.

	NaOH	HCl	Normalidad
a)	10 ml	10,40 ml	0,1172 N
b)	10 ml	10,40 ml	0,1172 N

Soluciones de Hidróxido de sodio.

Primera: con HCl 0,10669 N

	HCl	NaOH	Normalidad
a)	10 ml	8,75 ml	0,1219 N
b)	10 ml	8,75 ml	0,1219 N

Segunda: con HCl 0,1243 N

	HCl	NaOH	Normalidad
a)	10 ml	10,05 ml	0,1236 N
b)	10 ml	10,05 ml	0,1236 N

Soluciones reactivo de Sosaformalina (Rsf)

Primera: contra HCl 0,1172

	HCl	Rsf	Normalidad
a)	10 ml	11,70 ml	0,1001 N
b)	10 ml	11,70 ml	0,1001 N

Segunda: contra HCl 0,1172 N

	HCl	Rsf	Normalidad
a)	10 ml	9,70 ml	0,1208 N
b)	10 ml	9,70 ml	0,1208 N

Tercera: contra HCl 0,1172 N

	HCl	Rsf	Normalidad
a)	10 ml	11,0 ml	0,1065 N
b)	10 ml	11,0 ml	0,1065 N

Cuarta: contra HCl 0,1243 N

	HCl	Rsf	Normalidad
a)	10 ml	12,20 ml	0,1018 N
b)	10 ml	12,20 ml	0,1018 N

E N S A Y O S

**Titulación de Acido glutámico con Rsf 0,1001 N
usando fenolftaleína como indicador.**

Ensayos	mg	ml 0,1001 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	% encontrado
a)	150	18,0	18,0	17,64	88,2
b)	150	18,5	18,5	18,13	90,7

**Titulación de Acido glutámico utilizando NaOH 0,1219 N y
formalina neutralizada.**

Técnica seguida.

- 1) 10 ml. de formalina se neutralizaron con hidróxido de sodio.
- 2) Se pesó una cantidad exacta de Acido glutámico.
- 3) A la pesada se le agregó la formalina neutralizada.
- 4) Se procedió a titular con NaOH 0,1219 N y fenolftaleína como indicador.

Ensayos	mg	ml 0,1219 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	% encontrado
a)	155,3	16,1	19,6	18,32	91,5
b)	198,0	20,4	24,8	18,35	91,5
c)	155,0	16,0	19,5	18,09	90,5
d)	163,1	16,5	20,1	18,1	90,5

**Titulación de Acido sulfámico con Rsf 0,1208 N y fenolftaleína
como indicador.**

Ensayos	mg	ml 0,1208 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	% encontrado
a)	201,4	9,65	11,6	9,86	98,6
b)	251,6	12,05	14,5	9,86	98,6

**Titulación de Acido aminoacético con Rsf 0,1065 N y fenolftaleína
como indicador.**

Ensayos	mg	ml 0,1065 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	% encontrado
a)	168,4	20,20	21,5	9,46	94,6
b)	208,2	25,0	26,6	9,57	95,7

Titulación de Acido aminoacético con Rsf 0,1018 N y timolftaleína como indicador.

Ensayos	mg	ml 0,1018 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	% encontrado
a)	124,2	16,15	16,4	9,84	98,4
b)	171,1	22,20	22,6	9,71	97,1

Titulación de Acido aminoacético con NaOH 0,1236 N y formalina neutralizada; usando timolftaleína como indicador.

Ensayos	mg	ml 0,1236 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	% encontrado
a)	204,2	22,20	27,4	9,86	98,6
b)	139,5	15,2	18,7	9,91	99,1

Titulación de Acido aminoacético con NaOH 0,1236 N y formalina neutralizada; se usó fenolftaleína.

Ensayos	mg	ml 0,1236 N	ml 0,1 N	$\frac{\text{ml}}{\text{mmol}}$	5 encontrado
a)	143,5	14,70	18,2	9,46	94,6
b)	174,4	17,75	21,9	9,41	94,1

Tomando en cuenta que 1 mmol de ácido puro debe gastar 10 ml de álcali 0,1 N tratándose de ácidos monobásicos se calcula el porcentaje encontrado en cada ensayo mediante:

$$\frac{v}{10} \cdot 100; \text{ y para ácidos dibásicos } \frac{v}{20} \cdot 100.$$

CAPITULO V

RESUMEN

Se han estudiado, en este trabajo las bases teóricas de la determinación de aminoácidos, que se practica transformando estos ácidos en los ácidos metilenimínicos correspondientes que acto seguido se titulan con hidróxido de sodio.

Se ha podido demostrar que las constantes de disociación "aparentes" tienen valores determinables definidos y que se trata de ácidos sumamente débiles con constantes en la dimensión de 10^{-8} a 10^{-9} ("pK" cerca de 8,3 en el caso de la glicina).

Por esta razón la titulación de estos ácidos no puede practicarse usando como indicador la fenolftaleína, sino que deben usarse indicadores que viran a valores de pH más elevados como la timolftaleína o el amarillo de alizarina.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BLOCK R.
The Amino Acids Composition of Proteins and Foods.
299, 300 (1954).
- 2) BINKLEY Y DU VIGNEAUD.
J. Biol. Chem. 144, 507 (1942).
- 3) SCHMIDT.
The Chemistry of the Amino Acids and Proteins.
130, 67 (1944).
- 4) HAWK P. OSER B. SUMMERSON W.
Química Fisiológica Práctica 863-880 (1949).
- 5) VAN SLYKE Y HAMILTON.
J. Biol. Chem. 150, 231 (1940).
- 6) SOERENSEN.
Biochem. Ztschr, 7, 43, (1907) 25, 1, (1910).
- 7) HAHN F. L.
Analytica Chimica. Acta. 11, 396 (1954).
- 8) HALL W. T.
Química Analítica 546, 574, 578 (1949).
- 9) SCOTT W. W.
Standard Methods of Chemical Analysis 230, 236 (1939).
- 10) VILLAVECCHIA V.
Química Analítica Aplicada, Tomo 2, 502, 504 (1944).